

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



DETERMINACION DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE POLIFENOLES EN LA
TRILLA DE *Coffea arabica* (CAFE) DEL BENEFICIADO HONEY

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR
ADRIANA LISSETTE ESTRADA POLANCO
ANGELA MARGARITA GARCIA RIVAS

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

MARZO 2021

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

MAESTRO FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. REINA MARIBEL GALDAMEZ.

SECRETARIA

LICDA. EUGENIA SORTO LEMUS.

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

TRIBUNAL CALIFICADOR

INDUSTRIA DE ALIMENTOS Y TOXICOLOGIA.

MAE. Nancy Zuleima González Sosa.

CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS Y CÓSMETICOS.

MSc. Eliseo Ernesto Ayala Mejía.

DOCENTES AESORES

Lic. Mario Antonio Hernández Melgar.

Lic. Juan Agustín Cuadra Soto.

AGRADECIMIENTOS

De manera especial agradecemos a:

A Dios por brindarnos paciencia, sabiduría, tolerancia y acompañar cada uno de nuestros pasos para culminar nuestra carrera profesional.

A nuestros asesores Lic. Mario Antonio Hernández y Lic. Juan Agustín Cuadra, por toda su asesoría durante este trabajo de graduación, por su paciencia, dedicación como docentes y ayudarnos a culminar nuestra formación profesional.

A directora de trabajo de graduación MSc. Cecilia Gallardo por su tiempo al brindarnos alternativas de mejora y correcciones para la redacción de nuestra investigación y por motivarnos siempre a seguir adelante. A lo jurados MAE. Nancy Zuleyma González Sosa y MSc. Eliseo Ernesto Ayala Mejía por brindarnos su tiempo para realizar las correcciones pertinentes y así mejorar el desarrollo de nuestra investigación.

Al personal docente del Laboratorio de Investigación en Productos Naturales y Laboratorio de Análisis bromatológico, por brindarnos su apoyo al prestar sus instalaciones y equipos durante el desarrollo de nuestra investigación.

Al Señor Carlos Murcia, propietario de la finca industrial IBIZA, por brindar apoyo, dar apertura a sus instalaciones y facilitarnos la información necesaria para el desarrollo de nuestra investigación.

Un agradecimiento de manera especial a la jefatura de garantía de calidad y control de calidad de laboratorios Teramed y al jefe inmediato de Adriana Polanco por brindar los permisos necesarios para el desarrollo de la investigación.

Adriana Polanco y Margarita Garcia

DEDICATORIA

Mi trabajo de graduación se lo dedico de manera especial a Dios en primer lugar, por ser mi fuerza en todos estos años, donde su compañía en cada uno de mis pasos y decisiones siempre se ha manifestado de manera incondicional.

A Efraín Escobar (Mi Morshu) por ser, por estar y por darme el mejor de los ánimos, a pesar de todas las dificultades y sacrificios que se nos presentaron, por ser mi consejero, mi mejor amigo, mi mejor pareja, el que siempre me dijo vos podes y estuvo conmigo en cada una de mis facetas con tantos desvelos a lo largo de casi todo mi desarrollo profesional, sos la persona con el corazón más hermoso que he conocido a lo largo de mi vida. Gracias por no dejarme tirar la toalla, Siempre estaré agradecida contigo. (Si se pudo morshu); Te Amo.

A mi compañera de Tesis Margarita García, por su paciencia y tolerancia a lo largo de todo este tiempo, al fin Magui solo vos y yo sabemos lo que ha costado, pero al final lo logramos.

A Mama Bessy por ser la mejor abuela y consejera, gracias por darme el apoyo que siempre he necesitado y por ser como mi madre la amo mucho. Y a mis padres por estar apoyando en lo que estuvo a su alcance. A mi perrita Kuky que siempre viajo y se desveló incontables días hasta que yo me dormía después de estudiar, siempre un perrito es la mejor compañía para estudiar.

A mi grupo de amigos LA MANADA (Juan, Tony, Sergio, Charlie, Diana, kique) por ser parte de toda esta travesía en la Universidad son más que mis amigos, mi familia los quiero.

“Ve a tu ritmo, no veas relojes ajenos”

Adriana Polanco

DEDICATORIA

Agradezco primeramente a Dios, por brindarme la bendición de haber culminado mi proceso académico, por ser mi guía y por darme toda la sabiduría, protección, amor y misericordia durante toda mi vida.

Le dedico mi trabajo de graduación a mis padres, Wilfredo Armando Garcia y Neysis Inés Rivas de Garcia por todo su amor, comprensión, dedicación y fortaleza en toda mi formación académica y personal, gracias por darme el ejemplo para no decaer en la adversidad, por enseñarme a luchar y sobre todo por creer en mí en todo momento. Gracias infinitas por todo su apoyo incondicional y por sostenerme en los momentos más difíciles. Los amo inmensamente.

A mi abuelito, a mis tíos, tías y primos. Gracias por haber fortalecido mi proceso académico.

A mis amigas y compañeras, gracias por haber acompañado y brindado todo su apoyo durante este proceso.

A mi compañera de tesis Adriana Polanco, gracias por todo tu apoyo durante este proceso y por no por rendirte nunca.

Margarita García

INDICE

	Pág.
RESUMEN	
CAPÍTULO I	
1.0 INTRODUCCION	xviii
CAPITULO II	
2.0 OBJETIVOS	
CAPÍTULO III	
3.0 MARCO TEORICO	24
3.1 El Café	24
3.1.1 Nombre científico	24
3.1.2 Familia	24
3.1.3 Hábitat	24
3.1.4 Usos tradicionales	24
3.1.5 Principales constituyentes	24
3.2 Partes de la semilla del café	25
3.3 Generalidades del sitio de muestreo	26
3.4 Trillado de café	27
3.5 Procesos del café	27
3.5.1 Proceso natural o seco	28
3.5.2 Proceso húmedo o lavado	29
3.5.3 Proceso Honey	30
3.6 Los antioxidantes y las reacciones de oxidación	31
3.7 Clasificación de antioxidantes según el mecanismo de acción	32
3.7.1 Antioxidantes primarios	33

3.7.2	Antioxidantes secundarios	33
3.7.3	Antioxidantes terciarios	33
3.8	Clasificación de antioxidantes según su naturaleza	33
3.8.1	Antioxidantes enzimáticos	33
3.8.2	Antioxidantes no enzimáticos	34
3.9	Fuentes y formación de los radicales libres.	35
3.9.1	Fuentes endógenas	35
3.10	Tipos de radicales libres	38
3.10.1	Radical libres de oxígeno (ERO)	38
3.10.2	Radicales libres de nitrógeno (ERN)	39
3.11	Daño a biomoléculas como consecuencia del estrés oxidativo	39
3.12	Enfermedades o procesos asociados al daño oxidativo en la moléculas biológicas	41
3.13	Antioxidantes naturales	41
3.14	Estructuras de los compuestos fenólicos	42
3.15	Principales grupos de polifenoles	43
3.16	Propiedades de Polifenoles	45
3.17	Actividad antioxidante de los polifenoles	46
3.18	Papel de los polifenoles en la salud	46
3.19	Fundamento de extracción por Ultrasonido	47
3.19.1	Ultrasonido de señal	48
3.19.2	Ultrasonido de potencia	48
3.20	Determinación de actividad antioxidante utilizando el método DPPH	49

3.21 Espectroscopia UV-visible	50
3.22 Espectrofotómetro UV-visible	52
3.23 Transmitancia y Absorbancia	54
CAPITULO IV	
4.0 DISEÑO METODOLOGICO	57
4.1 Tipo de estudio	57
4.1.1 Estudio prospectivo	57
4.1.2 Estudio experimental	57
4.2 Investigación bibliográfica	57
4.3 Investigación de campo	57
4.3.1 Recolección de muestra de Trilla de café honey	58
4.3.2 Transporte y almacenamiento de la muestra de trilla de café honey	58
4.3.3 Universo y muestra	59
4.4 PARTE EXPERIMENTAL	59
4.4.1 Material, Equipo y Reactivos	59
4.4.2 Preparación de la muestra de trilla de café honey antes de la extracción	59
4.4.3 Preparación de las mezclas de solventes para la extracción de metabolitos	59
4.4.4 Extracción de metabolitos polifenólicos	60
4.4.5 Recuperación del extracto	60
4.4.6 Cuantificación de actividad antioxidante por medio del método DPPH	61
4.4.6.1 Preparación de la solución del método DPPH	

500 μM	61
4.4.6.2 Preparación de soluciones para obtener la curva de calibración con estándar Trolox	62
4.4.6.3 Preparación de la muestra de extracto recuperado de trilla de café	63
4.4.7 Determinación de actividad antioxidante en café Honey	63
4.4.7.1 Lectura de curva de calibración con estándar Trolox	63
4.4.7.2 Lectura de las muestras de extracto recuperado de café Honey	64
4.5 Diseño estadístico	64
CAPITULO V	
5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS	67
5.1 Información obtenida de cómo se realiza el beneficiado Honey	67
5.2 Extracción de metabolitos polifenolicos de trilla de café Honey, por medio de una mezcla de solventes utilizando el método ultrasonido	68
5.2.1 Preparación de las mezclas de solventes para la extracción de metabolitos	68
5.2.2 Extracción de metabolitos polifenolicos	69
5.2.3 Recuperación del extracto	70
5.3 Cuantificación de la actividad antioxidante del extracto obtenido utilizando el reactivo 2,2-difenil1-picril hidrazilo (DPPH)	72
5.3.1 Preparación de la solución del método DPPH 500 μM	72
5.3.2 Preparación de soluciones para curva de calibración con estándar Trolox	72

5.3.3	Determinación de actividad antioxidante de trilla de café Honey	72
5.4	Evaluación estadística de los resultados	77
5.4.1	Prueba de igualdad de varianzas	78
5.4.2	Método de análisis ANOVA	79
CAPÍTULO VI		
6.0	CONCLUSIONES	86
CAPÍTULO VII		
7.0	RECOMENDACIONES	88
BIBLIOGRAFIA		
ANEXOS		

INDICE DE FIGURAS

Figura N°	Pág. N°
1. Corte de una cereza de café	26
2. Parte final del proceso natural o seco	29
3. Parte final del proceso húmedo o lavado	30
4. Parte final del proceso Honey	31
5. Fenol	42
6. Estructura básica de los flavonoides	42
7. Principales grupos de polifenoles de alimentos	44
8. Principales grupos de polifenoles de alimentos	45
9. Extracción por Ultrasonido	48
10. Espectro electromagnético	50
11. Transiciones electrónicas en el formaldehído	51
12. Transición electrónica y espectros de los átomos	52
13. Espectrofotómetro	53
14. Gráfico de curva de calibración del estándar Trolox.	73
15. Gráfica de probabilidad de muestras de mezcla hidroalcohólica 50:50, mezcla hidroalcohólica 70:30 y	78

solvente acuoso.

16. Gráfico de prueba de igualdad de varianzas para mezcla hidroalcohólica 50:50, mezcla hidroalcohólica 70:30 y solvente acuoso. 79
17. Gráfica de intervalos para mezcla hidroalcohólica 50:50, mezcla hidroalcohólica 70:30 y solvente acuoso. 82

INDICE DE TABLAS

Tabla N°	Pág. N°
1. Clasificación de las especies reactivas de oxígeno	38
2. Clasificación de las especies reactivas del nitrógeno	39
3. Enfermedades o procesos asociados al daño oxidativo en las moléculas biológicas	41
4. Resultados de curva de calibración del estándar Trolox	73
5. Resultados de absorbancias y concentración obtenidos en la determinación de actividad antioxidante en muestras de trilla de café honey.	74
6. Información del factor	80
7. Resultados de método Análisis de Varianza	81
8. Resultado de las medias obtenidas en análisis ANOVA	82
9. Comparaciones en parejas de Tukey con información agrupada utilizando índice confianza del 95%.	83

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

1. Sitio de muestreo.
2. Esquema de los procesos de beneficiado de café.
3. Entrevista realizada a propietario de finca industrial Ibiza.
4. Recolección de la muestra de trilla de café honey.
5. Almacenamiento de la muestra de trilla de café honey.
6. Materiales, Equipo y Reactivos.
7. Preparación de la muestra de trilla de café honey antes de la extracción.
8. Preparación de las mezclas de solventes para la extracción de metabolitos.
9. Extracción de metabolitos polifenólicos.
10. Códigos de identificación de muestras.
11. Recolección de pesos de muestra de trilla de café.
12. Recuperación del extracto.
13. Recolección de resultados de pesos constantes de tubos de centrifugas con muestra de extracto recuperado de trilla de café honey para muestra extraídas con mezcla hidroalcohólica 50:50, mezcla hidroalcohólica 70:30 y solvente acuoso.
14. Preparación de reactivo DPPH 0.005 M.
15. Cuantificación de actividad antioxidante por medio del método DPPH.
16. Preparación de muestra de extracto recuperado de trilla de café.
17. Lectura de la muestra de extracto recuperado de trilla de café.
18. Recolección de resultados de absorbancias obtenidas de curva de calibración y muestras.
19. Recopilación de imágenes de los procesos realizados.

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación se determinó de la Actividad Antioxidante de polifenoles presentes en la trilla de *Coffea arabica* (café) del beneficiado honey, procedente de la finca industrial Ibiza ubicada en el cantón El Zarzal, municipio de la Palma, departamento de Chalatenango, en el que se obtuvo información del proceso honey donde se resaltan las abundantes ventajas en el sector cafetalero, además se estudió el trillado, medio que permite obtener la trilla de café que es un subproducto descartable; la que fue adquirida por medio de un muestreo dirigido por el propietario de la planta industrial, realizado en marzo de 2019.

Se extrajeron los metabolitos polifenolicos presentes en el analito, utilizando tres tipos de solventes: mezcla hidroalcohólica 70:30, 50:50 y solvente acuoso, empleando el método ultrasónico para obtener el extracto en estado líquido, posteriormente se concentraron las muestras en el equipo Genevac EZ-Plus para obtener extracto en estado sólido. Para cuantificar la actividad antioxidante se utilizó el reactivo 2,2-difenil-picril hidrazilo (DPPH), que en su forma de radical libre, sufre una reducción en presencia de un antioxidante, por medio de espectrofotometría UV-Visible, tomando en cuenta el reactivo Trolox como estándar comparativo en el análisis obteniendo resultados positivos.

Estadísticamente los resultados se evaluaron utilizando la herramienta de varianza ANOVA, indicando que existe una diferencia significativa de actividad antioxidante en cada una de las mezclas de analito, además el método estadístico Tukey indica que la extracción con mezcla hidroalcohólica 50:50 posee mayor actividad antioxidante con una media de 29.29 μM .

Esta investigación sirve como fuente de información para generar un valor agregado a la trilla del café y que de esta manera se pueda estandarizar la metodología para obtener antioxidantes con fines destacados en la industria.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

El Café es un grano de importancia estratégica para la sostenibilidad económica, social y ambiental de El Salvador, a pesar de una pérdida relativa en el impacto dentro de la economía; generada por la dependencia que se tiene de los precios internacionales. Dicha dependencia, hace necesario realizar una búsqueda de alternativas que puedan ser factibles técnica y económicamente para dinamizar el sector cafetalero. Una de las alternativas es el aprovechamiento de los subproductos que son generados en el beneficiado de café (etapas de procesamiento a la que se somete el café para eliminar todas sus cubiertas), como insumo para fabricar otros productos; aportando valor agregado al sector cafetalero.

En las últimas décadas se han logrado avances significativos para obtener sustancias químicas o biológicas que sean menos tóxicas para el ambiente, el hombre, y más selectivas respecto a los propósitos que se persiguen. Uno de esos propósitos es encontrar la manera de obtener productos antioxidantes de origen natural que contribuyan a disminuir la acción de radicales libres en el cuerpo humano ya que estos radicales libres pueden inducir a daños oxidativos a las biomoléculas.

Desde la óptica industrial el estudio contribuye a articular la actividad cafetalera con otras actividades productivas de la economía, para convertirse en suministradores principales de algunos subsectores de la industria nacional, reduciendo los elevados índices de importación de productos que pueden ser fabricados localmente.

Debido a que se estudia la trilla o cascarilla de café del beneficiado Honey, el cuál es un subproducto que puede valorarse como una fuente de compuestos polifenólicos; de manera que, esta investigación se ha centrado en la extracción de polifenoles y en la determinación de la actividad antioxidante.

En El Salvador no existen estudios que registren el aprovechamiento de este subproducto y por lo tanto el sector cafetalero desecha el material residual del beneficiado de café constituyendo un riesgo para el medio ambiente y de esta manera a nivel industrial no surgen alternativas de diversificación viables que contribuyan de alguna manera a mejorar sustancialmente el aprovechamiento de este residuo agroindustrial, tanto en el área farmacéutica, cosmética y alimenticia. Debido a la importancia que tiene la actividad antioxidante de los polifenoles, es necesario dar a conocer al sector cafetalero una manera viable de reutilizar la trilla y que este pueda convertirse en suministrador principal por medio de automatización de procesos de beneficiado de la trilla de café Honey, a algunos subsectores de la industria nacional.

La investigación se llevó a cabo en un período de febrero a agosto de 2019, los análisis se realizaron en el Laboratorio de Análisis Bromatológico, Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

Se tomaron las muestras de trilla de café, en la planta industrial IBIZA del municipio de la palma, departamento de Chalatenango, aplicando un plan de muestreo dirigido, a la que se realizó la determinación de la actividad antioxidante por medio del reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), mediante el análisis espectrofotométrico UV visible para ello se obtuvo la extracción de metabolitos por medio del método ultrasónico en la que se utilizaron como solventes dos mezclas hidroalcohólicas y una solución acuosa; y para la recuperación del extracto se evaporó el solvente empleando el equipo Genevac EZ-plus. De tal manera los resultados se analizaron estadísticamente utilizando la herramienta de varianza ANOVA para conocer la diferencia significativa de actividad antioxidante entre las mezclas; Así también se utilizó el método estadístico Tukey del cual se obtuvo un resultado significativo, sobre la mezcla que tienen mayor actividad antioxidante que poseen los metabolitos presentes en la trilla del café,

del beneficiado Honey.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Determinar la actividad antioxidante de polifenoles en la trilla de *Coffea arábica* (café), del beneficiado Honey.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1** Obtener información de cómo realiza el proceso de beneficiado Honey, conocer sus ventajas y desventajas con respecto a otros beneficiados.
- 2.2.2** Extraer metabolitos polifenolicos de trilla de café Honey, por medio de una mezcla de solventes utilizando el método ultrasonido.
- 2.2.3** Cuantificar la actividad antioxidante del extracto obtenido utilizando el reactivo 2,2-difenil1-picril hidrazilo (DPPH).
- 2.2.4** Evaluar estadísticamente los resultados obtenidos para determinar si existe diferencia significativa entre las mezclas de solventes utilizadas para la extracción de polifenoles en la trilla del café, del beneficiado honey, por medio de los métodos estadísticos ANOVA y Tukey.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 El Café

3.1.1 Nombre científico

Coffea arábica. L

3.1.2 Familia

Rubiaceae

3.1.3 Hábitat

El árbol de café tiene su centro de origen en Abisinia (en la actual Etiopía), en el oriente de África. En el mundo sobresalen por su importancia comercial, la especie de los cafés arábigos y los de los cafés robustos. La primera especie abarca casi las tres cuartas partes de la producción mundial y se cultiva principalmente en Centro y Sur de América.

3.1.4 Usos tradicionales

En general, la planta es usada como tónico, estimulante, diurético, hemostático, broncodilatador y para el dolor de cabeza.

3.1.5 Principales constituyentes

La semilla ha sido ampliamente estudiada y contiene, entre otros componen alcanos: acetaldehídos, N-propil-amina, etilamina, cafeína: bencenoides: arbutino, benzaldehído, hidroxiquinona, 3,4-dihidroxi-acetofenona, esteroides: 5-dehidro-avenasterol, campesterol, fucosterol; fenilpropanoides: ácido cumárico, ferúlico, caféico, clorogenico, A, B y C isoclogenico; lípidos: acido araquidónico, proteínas: trigonelina (2.9%), glicina.

En la semilla tostada se encuentran sustancias como ácidos orgánicos: acético,

crotónico, cítrico, alcanos: acetona, 2-butanona; alicíclicos ciclopentanona y derivados, ácido 2,3 dimetil acrílico y derivados, 2-metil-2-buten-1-al; alcaloides: pirazina y derivados, cafeína, tofilina; bencenoides: -guayacol y derivados, orto-cresol, ácido benzoico y derivados, 3,4 dihidroxibenzaldehído; compuestos sulfurados: disulfito de carbono, etanetiol; heterocíclicos oxigenados: 4-(2-furil)-3-buten-2-ona, furano y derivados, furfural y derivados; lactonas: 2,3 dimetil-2-buten-1-al, g-butirolactona; lípidos: ácido linoleico.

La hoja contiene alcaloides; ácido alantoico, alantoina, cafeína, tofilina; terpenos: cafestrol, ácido ursólico; proteínas: histidina, hidroxiprolina, ácido pipercolico; flavonoides: quercetina-3-O-glucosido.

3.2 Partes de la semilla del café. ^{(3) (15)}

Los granos de café o semillas están contenidos en el fruto del arbusto, los cuales en estado de madurez toman un color rojizo y se les denomina "cereza". Cada una de ellas consiste en una piel exterior que envuelve una pulpa dulce. El fruto del cafeto cuyas semillas tostadas y molidas se utilizan para el consumo humano está compuesto, de afuera hacia adentro por:

- La pulpa de café es el primer producto que se obtiene durante el procesamiento, y representa en peso seco alrededor del 29% del peso de la baya entera.
- Una cubierta dura que se denomina pergamino o cáscara que encierra los granos de café y representan aproximadamente el 12% de la baya en peso seco.
- Una cubierta más delgada y fina llamada, silver skin, piel plateada, o trilla que es un tegumento del grano del café obtenido como subproducto del proceso de tostado. Es un residuo con alta concentración de fibra dietética soluble (86% de la fibra dietética total) y teniendo alta capacidad antioxidante, probablemente debido a la concentración de compuestos fenólicos, así como debido a la presencia de otros compuestos.

- Una cubierta más delgada y fina llamada, silver skin, piel plateada, o trilla que es un tegumento del grano del café obtenido como subproducto del proceso de tostado. Es un residuo con alta concentración de fibra dietética soluble (86% de la fibra dietética total) y teniendo alta capacidad antioxidante, probablemente debido a la concentración de compuestos fenólicos, así como debido a la presencia de otros compuestos.

- Una sustancia gelatinosa azucarada que recibe el nombre de mucílago; El mucílago constituye una capa de aproximadamente 0.5-2 mm de espesor que está fuertemente unida a los cascarones de café. Desde el punto de vista físico, es un sistema líquido coloidal, y al ser un hidrogel es liófilo. Químicamente, el mucílago contiene agua, pectinas, azúcares y ácidos orgánicos.

- Y finalmente el grano o almendra que es la parte del fruto que, una vez tostada y molida, se utiliza para la producción del café. (Ver Figura N°1)

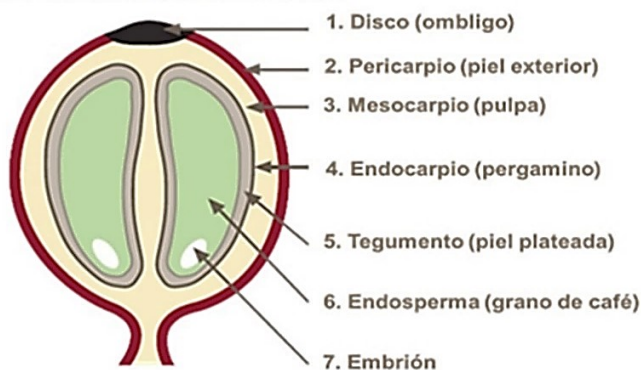


Figura N°1. Corte de una cereza de café ⁽³⁾

3.3 Generalidades del sitio de muestreo.

⁽²⁾ ⁽³⁰⁾ Al menos en la mitad de la superficie de Chalatenango se puede sembrar café. Diferentes organizaciones están interesadas en mostrar a los agricultores las ventajas de este cultivo. La altura sobre el nivel del mar (msnm) en las tierras del

departamento supera los 500 metros. Hay muchos sitios a más de 1000 metros e incluso a 1500 msnm, que son óptimas para el desarrollo del café.

La planta industrial Ibiza se fundó en enero de 2015, por la familia Murcia Lemus, nace como un forma de emprendedurismo y demostrar que en el departamento se podía producir buen café, además de conocer más sobre la siembra y cosecha del café en las diferentes variedades y procesos junto con la exportación del mismo; La planta está ubicada en caserío el zarzal, cantón el gramal la Palma, departamento de Chalatenango, con una altura entre 1380 msnm y 1400 msnm, con una extensión territorial de aproximadamente 12 manzanas (Ver anexo N°1) y se obtienen de 15 a 18 quintales de café por manzana, las variedades de café en las que se centran sus cultivos son variedad Pacamara: Cruce propio salvadoreño tiene que tiene más de 50 años, variedad pacas, variedad borbon y variedad catimor. Actualmente la trilla de café del beneficiado Honey la almacenan en bolsas plásticas para su posterior descarte en los cafetales siendo este utilizado como abono.

3.4 Trillado de café

El trillado o curado del café se hace antes de la exportación, y consiste en separar, descascarillar o pelar la cubierta del grano eliminando por pulimento las cascaras plateadas y finalmente su clasificación.

Hay diferentes aparatos diseñados para esta tarea, pero muchos basados en fricción por medio de tambores, discos, rotores y cuchillas, pero todos cumplen la misma función: decorticar el grano, dependiendo del tipo de grano y su humedad.⁽³⁾

3.5 Procesos del café

En la actualidad hay diferentes métodos en los que el café puede ser procesado después de la recolección. Estos procesos dependen de cuestiones ambientales

(clima, porcentajes de precipitación, disponibilidad de agua etc.)⁽⁶⁾ (Ver anexo N°2)

3.5.1 Proceso natural o seco

El método por vía seca es también conocido como proceso natural y es tal vez el más antiguo y el más sencillo ya que requiere poca maquinaria (aunque más labor). El método consiste en secar la cereza entera después de haberla recolectado, sin remover la piel o cáscara. Las formas en las que este proceso se lleva a cabo pueden variar dependiendo de las instalaciones de las que se disponga o el tamaño de la plantación/producción, pero en términos generales, este es el proceso:^{(3) (6)}

-Se clasifican y limpian las cerezas recolectadas, para separar las que no estén maduras o estén dañadas o afectadas por algún insecto; Esto puede hacerse a mano o también en canales de lavado, donde las cerezas maduras flotan y las defectuosas o verdes se van al fondo del canal.

-Se tienden las cerezas en patios de secado (generalmente) o en enteras o camas levantadas del piso (camas africanas).

- A medida que las cerezas se van secando, se deben ir moviendo para que todas se sequen por igual. El secado en este tipo de proceso tarda generalmente 20 días, aunque dependiendo de las condiciones climáticas, podría llegar a tardar hasta cuatro semanas.

La etapa de secado es de vital importancia ya que afecta la calidad final del café verde, y naturalmente el sabor: si se seca demasiado, el café se volverá quebradizo y puede dañarse en la trilla. Un grano quebradizo es un grano defectuoso. Si no se seca suficiente, tendrá demasiada humedad y será mucho más susceptible a hongos y bacterias. (Ver figura N°2)



Figura N°2. Etapa de secado del proceso natural o seco. ⁽³⁾

3.5.2 Proceso húmedo o lavado: ⁽³⁾

El proceso de lavado implica la eliminación completa del mucílago, y se separan la pulpa de los granos de café, lo que no sucede en el proceso seco o natural, esto se realiza mediante el uso de fricción, fermentación y lavados con agua (Ver figura N°3), el proceso se realiza de la siguiente manera:

- El fruto de la planta de café, se recoge maduro de las ramas. La madurez del fruto se determina por un cambio en su pigmentación exterior a tonalidades rojas, amarillas o naranjas.
- Posterior a la cosecha, los frutos son transportados a las estaciones de lavado donde se pesan y se cargan en una máquina de despulpado.
- El fruto es entonces rajado ya sea por una cuchilla afilada de metal o plástico y ambos granos de café son presionados hacia el exterior, revelando ambos granos con su respectivo mucilago.
- En el proceso de lavado el mucilago se elimina mediante fermentación o utilizando métodos mecánicos.

En tanques de fermentación las bacterias y otros microorganismos presentes de forma natural descomponen los azúcares y alcoholes debilitando las estructuras

de aferramiento del mucílago al exterior del pergamino. La fermentación puede durar de seis horas a cuatro días dependiendo del perfil de sabor deseado, cantidad de mucílago, clima, temperatura y humedad. La habilidad y el arte de la fermentación pueden tener un impacto dramático en la calidad general y la claridad de café. La fermentación por si sola puede llegar a eliminar la totalidad del mucílago.

- Después de la eliminación del mucílago los granos se lavan completamente para quitar cualquier restante. Seguidamente, los granos se pasan por un proceso de secado, ya sea al sol en patios o lechos de secado, o mecánicamente en tambores o secadores verticales.
- Los granos de café se almacenan con su respectivo pergamino, la capa de protección restante.
- Por último, se remueve el pergamino del grano y se preparan para su procesamiento posterior.



Figura N°3. Parte final del grano del proceso húmedo o lavado ⁽³⁾

3.5.3 Proceso Honey: ⁽³⁾⁽⁶⁾ ⁽¹⁹⁾

Esta forma de preparar el café es fundamentalmente la misma que en el método lavado, con la única diferencia que en el proceso Honey no se remueve el mucílago, sino que se seca el café con esta sustancia que está compuesta por agua, pectinas, azúcares y ácidos orgánicos y que al tacto se siente pegajoso como la miel recubriendo aun los granos (Ver figura N°4), este proceso se realiza

de la siguiente manera:



Figura N°4 Parte final del grano del proceso Honey ⁽¹⁶⁾

- El fruto de la planta de café se recoge maduro de las ramas. La madurez del fruto se determina por un cambio en su pigmentación exterior a tonalidades rojas, amarillas o naranjas.
- Posterior a la cosecha los frutos son transportados y se cargan en una máquina de despulpado.
- El fruto es entonces rajado ya sea por una cuchilla afilada de metal o plástico y ambos granos de café son presionados hacia el exterior, revelando ambos granos con su respectivo mucílago.
- El pergamino y el mucílago restantes se llevan a secar directamente al sol en patios o lechos de secado, omitiéndose la etapa de fermentación y de lavado que se produce en este punto en el café lavado.
- Los granos de café se almacenan con su respectivo pergamino, la capa de protección restante y luego se procede al trillado.

3.6 Los antioxidantes y las reacciones de oxidación ^{(10) (17) (15)}

Un antioxidante puede definirse como “cualquier sustancia que en

concentraciones bajas en comparación con la sustancia oxidada retrasa o inhibe significativamente la oxidación de esta sustancia”. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres los cuales son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado, por lo que son muy reactivos, ya que tienden a captar un electrón de otros átomos con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. El término “radical libre” enfatiza una reactividad más alta comparada con moléculas cuyos átomos están ligados a otros por covalencia (enlace por compartición de electrones). Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón (reducción) que necesita, la molécula estable que lo pierde (oxidación) se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena que dañan las células.

El antioxidante al reaccionar con el radical libre le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un radical libre débil, con escasos o nulos efectos tóxicos y que en algunos casos como la vitamina E, pueden regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes.

En la protección de las células contra la oxidación actúa diferentes niveles de defensa antioxidante en los que participan enzimas, moléculas secuestrantes de electrones y nutrientes.

En el organismo existe un equilibrio entre las especies reactivas de oxígeno y los sistemas de defensa antioxidante. Cuando dicho equilibrio se descompensa a favor de las especies reactivas de oxígeno se produce el denominado estrés oxidativo. Los sistemas de defensa frente a los radicales libres los podemos clasificar según su mecanismo de acción, o según su naturaleza.

3.7 Clasificación de antioxidantes según el mecanismo de acción: ⁽¹⁴⁾

A su vez los podemos clasificar en primarios, secundarios y terciarios

3.7.1 Antioxidantes primarios

Previenen la formación de nuevos radicales libres, esto lo consiguen convirtiendo los radicales libres existentes en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar o evitando la formación de radicales libres a partir de otras moléculas.

3.7.2 Antioxidantes secundarios

Capturan los radicales evitando las reacciones en cadena, la mayoría de estos compuestos son diarilaminas y fenoles capaces de aceptar el electrón desapareado del radical libre y de estabilizarlo en su estructura, evitando así la propagación de la cadena radicalaria.

3.7.3 Antioxidantes terciarios

Reparan las biomoléculas dañadas por los radicales libres, incluyen enzimas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa.

3.8 Clasificación de antioxidantes según su naturaleza: ⁽¹⁴⁾

Se clasifican en enzimáticos y no enzimáticos

3.8.1 Antioxidantes enzimáticos

- Superóxido Dismutasa (SOD)

Elimina los radicales superóxidos.

Primera línea de defensa.

- Glutación peroxidasa.

Remueve H_2O_2 e hidroperóxidos orgánicos.

Cada una de las subunidades contiene un átomo de selenio que es esencial para su actividad.

- Catalasa

Cataliza la descomposición del H_2O_2 para formar agua y oxígeno. Junto con la peroxidasa actúa como protector de la hemoglobina y otras proteínas ricas en grupos tiolicos frente a la oxidación.

3.8.2 Antioxidantes no enzimáticos

- Vitamina C (ácido ascórbico)

Neutraliza directamente al ion superóxido, radical oxidrilo, oxígeno singlete.

Regenera la forma oxidada de la vitamina E.

- Glutatión

Principal sistema de defensa a nivel intracelular frente a las agresiones oxidantes.

Interviene en la síntesis del DNA.

Participa en la detoxificación de xenóbioticos.

Actúa como protector frente a la radiación y al estrés oxidativo.

- Vitamina E

Neutraliza el radical superóxido.

Protege las membranas biológicas por ser liposoluble.

Inhibe la fase de propagación de la cadena de la lipoperoxidación.

- Carotenoides

β - caroteno: posee actividad antioxidante.

Se ha descrito como el más importante neutralizador del oxígeno singlete aislado de la naturaleza.

- Ácido úrico

Potente actividad antioxidante.

Elimina radicales OH^\cdot

-Iones metálicos: transferrina

Quelar iones de metales responsables de la reacción de Fenton.

3.9 Fuentes y formación de los radicales libres.

3.9.1 Fuentes endógenas

- La cadena de transporte electrónico mitocondrial

En los tejidos sanos una de las principales fuentes de radicales libres son las mitocondrias. Orgánulos responsables de más del 90% del consumo de oxígeno celular. La cadena de transporte electrónico mitocondrial es una de las principales fuentes de radicales libres en la célula. Son muchas las patologías en las que se ha descrito que la mitocondria genera radicales libres, siendo una de las causas del estrés oxidativo que sufre la célula.

- Reducción Monovalente del oxígeno y cadena respiratoria

En la producción de radicales libres en los distintos estados mitocondriales se calcula que entre el 1% y el 2% de los electrones transportados por la cadena de transporte electrónico mitocondrial en estado 4 (cuando todo el ADP está en

forma de ATP) no llegan al complejo IV y producen reducciones parciales del oxígeno. Debido a las propiedades del oxígeno, su reducción tetravalente requiere la transferencia sucesiva de 4 electrones al orbital anti enlazante.

El citocromo a₃ del complejo IV de la cadena respiratoria es capaz de mantener estrechamente unidas a su centro activo todas las especies parcialmente reducidas del oxígeno hasta que se completa la transferencia de 4 electrones y 4 protones al O₂ y con ello la formación de H₂O. Por tanto, el citocromo c oxidasa perteneciente al complejo IV de la cadena respiratoria no produce este radical.

Además, exhibe cierta actividad superóxido dismutasa. Sin embargo, otros elementos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial tienen la capacidad de transferir un electrón directamente al O₂, pero por el contrario no son capaces de retener el ion superóxido formado. Así pues, se produce O₂⁻, que puede disputar a su vez generando peróxido de hidrógeno, el cual es capaz de atravesar las membranas y salir al citoplasma, donde puede reaccionar con otras especies formando diversos tipos de radicales libres.

- Autooxidación ^{2) (19)}

La autooxidación de compuestos de carbono reducido como son aminoácidos, proteínas, lípidos, glúcidos, y ácidos nucleicos dan lugar también a la formación de radicales libres.

Sistemas de transporte electrónico del retículo endoplasmático y membrana nuclear. Ambos sistemas de membranas intracelulares contienen los citocromos P450 y b₅ que pueden oxidar ácidos grasos insaturados y xenobióticos. De hecho, los citocromos P450 (término usado para un número muy elevado de proteínas con grupos hemo, ampliamente distribuidas entre los seres vivos) son los más poderosos oxidantes in vivo, aunque también pueden actuar como agentes reductores. Son mono oxigenasas que actúan activando el oxígeno molecular a especies electrofílicas de oxígeno (bien radicales, o bien generadoras a su vez de radicales) que pueden ser liberada en la célula.

- Peroxisomas ⁽¹⁹⁾

Los peroxisomas son potentes fuentes celulares de producción de peróxido de hidrógeno debido a su alta concentración en oxidasas, ninguna de las cuales utiliza el superóxido como precursor de este. Entre estas enzimas están incluidas la D-aminoácido oxidasa, urato oxidasa, L- α -hidroxiácido oxidasa y acilgraso-coenzima A oxidasa. La catalasa peroxisomal es la enzima que metaboliza la mayor parte del peróxido de hidrógeno generado por las oxidasas de los peroxisomas.

- **Xantina oxidasa.** ⁽¹⁹⁾

La xantina oxidasa es un enzima muy versátil que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza (desde las bacterias hasta el hombre). Representa otra fuente de radicales libres. Cataliza la oxidación de muchos sustratos, bien sean endógenos como las purinas o exógenos como el etanol. La principal función a nivel fisiológico es la oxidación de la hipoxantina y de la xantina a ácido úrico en dos pasos sucesivos de oxidación.

3.9.2 Fuentes exógenas ⁽¹⁹⁾

- Factores ambientales

Como contaminantes aéreos fotoquímicos, hiperoxia, pesticidas, humos del tabaco, solventes, anestésicos e hidrocarburos aromáticos. Estos agentes, o bien poseen radicales libres, como el humo del tabaco, o bien se convierten en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación.

- Agentes antineoplásicos y antibióticos.

Algunos de los efectos de estas drogas se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a superóxido, peróxido de hidrógeno, Introducción de hidrógeno y radical hidroxilo; algunos antibióticos que dependen de la unión a metales para su actividad.

3.10 Tipos de radicales libres. ⁽¹⁴⁾

Los radicales libres pueden ser:

De oxígeno: ERO (Especies Reactivas del Oxígeno)

De nitrógeno: ERN (Especies Reactivas del Nitrógeno).

3.10.1 Radical libres de oxígeno (ERO)

Habitualmente el oxígeno se encuentra en su forma más estable, la molécula diatómica O_2 , presentando los electrones que forman parte del enlace π anti-enlace el mismo espín (estado triplete). En esta forma el oxígeno es solo moderadamente reactivo. Sin embargo, por efecto de radiaciones ionizantes, o por la acción de enzimas, o por mecanismos puramente químicos, se pueden generar una serie de especies químicas (radicales libres) capaces de reaccionar con otros compuestos presentes en el organismo y consecuentemente producir daño celular. Las ERO pueden tener un origen endógeno o exógeno. Algunas de ellas surgen como “accidentes químicos”, es decir, reacciones secundarias no deseadas entre las biomoléculas o en la detoxificación de xenobióticos, pero otras especies activadas de oxígeno in vivo se generan con un fin determinado, como en el caso de los fagocitos activados, que producen O_2 y H_2O_2 . Las ERO son radicales libres donde el electrón desapareado se sitúa predominante sobre el átomo de oxígeno. La toxicidad del O_2 se explica entonces debido a la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs). (Ver tabla N° 1)

Tabla N° 1. Clasificación de las especies reactivas de oxígeno

Especie	Símbolo
Radical superóxido	O_2^-
Radical hidroperóxido	HO_2
Peróxido de hidrogeno	H_2O_2
Radical hidroxilo	HO^+

Tabla N°1. continuación

Oxígeno singlete	$^1\text{O}_2$
Radical alcóxilo	RO^+
Radical piróxilo	ROO^+
Ozono	O_3

3.10.2 Radicales libres de nitrógeno (ERN)

Las especies reactivas del nitrógeno representan otra clase de radicales libres a los cuales, en los últimos años, se les ha dado mucha importancia. Se pueden clasificar: (Ver tabla N°2)

Tabla N°2. Clasificación de las especies reactivas del nitrógeno ⁽¹⁵⁾

Especie	Símbolo
Óxido Nítrico	NO^+
Peróxido de Nitrógeno	ONOO^{2+}
Dióxido de Nitrógeno	NO_2^+

3.11 Daño a biomoléculas como consecuencia del estrés oxidativo.

⁽¹⁵⁾

Estrés oxidativo se define como una situación en la que existe tanto un aumento en la velocidad de generación de especies reactivas del oxígeno como una disminución de los sistemas de defensa, lo que resulta en una mayor concentración, en estado estacionario, de EROs. Es en esta situación de estrés oxidativo en la que se manifiestan las lesiones que producen los radicales libres.

La acción de los radicales libres viene determinada, por una parte, por su reactividad química, y, por otra parte, por la disponibilidad de un sustrato susceptible en la vecindad de donde se produce el radical libre. La acumulación de compuestos alterados por el resultado de la reacción del radical libre es a menudo la explicación de efectos a largo plazo, los cuales son difícilmente

demostrables como relación causa-efecto de la reacción de los radicales libres, pero las reacciones de los radicales libres provocan unos productos cuyo efecto es acumulativo.

Los organismos posean unos mecanismos de defensa contra los radicales libres, los antioxidantes, sustancias que son capaces de retrasar o inhibir la oxidación de sustratos oxidables.

El balance entre los agentes prooxidantes y antioxidantes determinará finalmente el estado redox, determinando una “homeostasis redox” o estado de equilibrio de las condiciones de oxidación-reducción. Finalmente, el desequilibrio de este estado redox tiene unas consecuencias bioquímicas de forma que altera ciertas vías de transmisión de señales cuya consecuencia es la activación de mecanismos compensatorios para restablecer la “homeostasis redox”.

Bajas concentraciones de antioxidantes o la inhibición de las enzimas antioxidantes causan estrés oxidativo y pueden dañar o producir la apoptosis de las células.

El estrés oxidativo puede originarse por dos situaciones:

- Disminución de antioxidantes debido la malnutrición (por ejemplo, ingesta dietética insuficiente de alfa-tocoferol, ácido ascórbico o aminoácidos azufrados necesarios para la generación de glutatión).
- Producción excesiva de especies reactivas de oxígeno, por ejemplo, exposición a altas concentraciones de oxígeno o a radiaciones, elevada concentración de contaminantes o excesiva activación de los sistemas naturales productores de radicales (en enfermedades crónicas inflamatorias como artritis reumatoide o situaciones agudas en las que se desencadena una respuesta inflamatoria sistémica como en la enfermedad grave).

3.12 Enfermedades o procesos asociados al daño oxidativo en las moléculas biológicas. ⁽¹⁴⁾

Tabla N°3. Enfermedades o procesos asociados al daño oxidativo en las moléculas biológicas. ⁽¹⁴⁾

Enfermedades	Daño oxidativo en las moléculas biológicas
Envejecimiento	<ul style="list-style-type: none"> - Peroxidación de los ácidos grasos de la membrana celular y daño al ADN. - Los radicales libres toman un electrón de las células tejido de colágeno, provocando que la piel pierda la elasticidad y como consecuencia la aparición de arrugas y sequedad.
Enfermedades del corazón.	<ul style="list-style-type: none"> - Peroxidación de lípidos en las partículas de LDL con daño de otros de sus componentes. - Los radicales libres dañan las grasas de la ingesta, llamada “grasa oxidada”, la grasa oxidada es grasa más pegajosa por lo que se adhiere a las paredes de las arterias con mayor facilidad pudiendo causar un infarto de miocardio.
Diabetes	<ul style="list-style-type: none"> - Autooxidación de la glucosa. - Disminución de la secreción de insulina en el páncreas por interferencia de los radicales libres.
Cáncer	- Daño al ADN
Cataratas	- Modificaciones irreversibles en las proteínas
Cuadros inflamatorios crónicos.	- Activación de genes relacionados con la respuesta inflamatoria
Enfermedades Neurodegenerativas	- Radicales libres de oxígeno inducen apoptosis y desdoblamiento de proteínas.

3.13 Antioxidantes naturales. ⁽⁸⁾

En los últimos años, el uso de antioxidantes naturales se ha promovido y la literatura ha reconocido que la sustitución de los antioxidantes sintéticos por los

naturales puede tener varias ventajas.

La investigación sobre antioxidantes naturales se ha centrado principalmente en compuestos fenólicos, flavonoides, en particular, como posibles fuentes de antioxidantes naturales. Los compuestos fenólicos son agentes reductores y su potencial relacionado con la salud le ha atribuido a su capacidad antioxidante propiedades de gran alcance que pueden proteger al organismo de las reacciones de oxidación causados por radicales libres.

3.14 Estructuras de los compuestos fenólicos. ⁽¹⁵⁾

El término fenoles comprende aproximadamente 8000 compuestos que aparecen en la naturaleza. Todos ellos poseen una estructura común: un anillo fenol -un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo (Ver figura N°5).

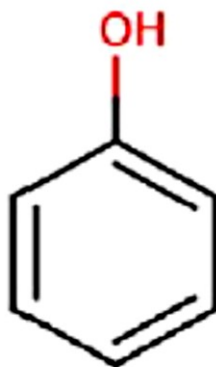


Figura N°5. Fenol ⁽¹⁵⁾

Los flavonoides son los polifenoles que poseen al menos 2 subunidades fenólicas; los compuestos que tienen 3 o más subunidades fenólicas se denominan taninos (Ver figura N°6)

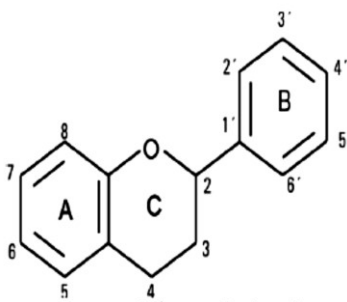


Figura N°6: Estructura básica de los flavonoides. ⁽¹⁵⁾

Los flavonoides son derivados fenólicos sintetizados en cantidades substanciales por las plantas. Comprenden alrededor de 4000 compuestos identificados, son derivados hidroxilados, metoxilados y glicosilados de la 2 fenil benzo y pirano, que consiste en dos anillos benceno combinados por mediación del oxígeno contenido en el anillo pirano. Estos compuestos poseen actividad antioxidante y capacidad para capturar radicales libres.

La actividad antioxidante de los distintos grupos de compuestos depende de la estructura individual y del número de oxidrilos sustituyentes, así como del peso molecular. En los flavonoides, esta característica se asocia con la presencia en la molécula de grupos orto dihidroxi en el anillo B, un doble enlace entre el C₂ y C₃ en conjunto con la posición 4-oxo en el anillo C, y grupos 3-5 hidroxilo, y la función 4 – oxo en los anillos A y C.

3.15 Principales grupos de polifenoles.

⁽¹⁵⁾

En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Estos compuestos podemos denominarlos polifenoles. Se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales. Otros participan en funciones de defensa ante situaciones

de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.).

La biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido shikimico y la ruta de los poliacetatos: La ruta del ácido shikimico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano). La ruta de los

poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas. Las rutas mixtas combinan precursores tanto de la vía del ácido shikimico como de la ruta de los poliacetatos.

Este es el caso de un importante grupo de moléculas biológicamente activas, denominadas genéricamente flavonoides. Los flavonoides, nombre que deriva del latín “flavus”, cuyo significado es “amarillo”, constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal.

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común difenilpirano (C₆-C₃-C₆'), compuesto por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterociclico.

Los átomos de carbono individuales de los anillos A, B y C se numeran mediante un sistema que utiliza números ordinarios para los anillos A y C, y números primos para el anillo B. De los tres anillos, el A se biosintetiza a través de la ruta de los poliacetatos, y el anillo B junto con la unidad C₃ proceden de la ruta del ácido shikimico.

Todos los flavonoides son estructuras hidroxiladas en sus anillos aromáticos, y son por lo tanto estructuras polifenolicas. Los principales subgrupos de compuestos flavonoides son: flavonoles, flavonas, flavanonas (dihidroflavonas), isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (Ver figura N° 7 y 8)

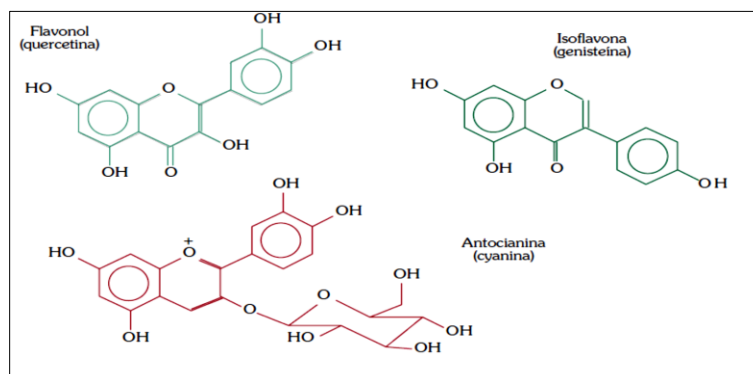


Figura N°7. Principales grupos de polifenoles de alimentos ⁽¹⁵⁾

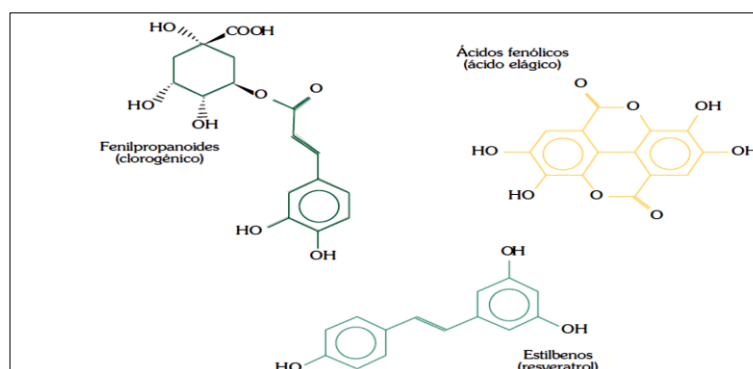


Figura N°8. Principales grupos de polifenoles de alimentos ⁽¹⁵⁾

3.16 Propiedades de Polifenoles ⁽⁸⁾

Una vez ingeridos, los polifenoles son reconocidos por el cuerpo humano como xenobióticos y, por lo tanto, su biodisponibilidad es relativamente baja en comparación con los micronutrientes y los macronutrientes. Además, dependiendo de su grado de complejidad estructural y polimerización, estos compuestos pueden absorberse fácilmente en el intestino delgado (es decir, polifenoles de bajo peso molecular tales como estructuras monoméricas y diméricas) o llegar al colon casi sin cambios (oligoméricos y polifenoles poliméricos tales como taninos condensados o hidrolizables, que alcanzan

valores de peso molecular cercanos a 40,000 Da) Se ha estimado que solo el 5-10% de la ingesta total de polifenoles se absorbe en el intestino delgado. Los polifenoles restantes (90-95% de la ingesta total de polifenoles) pueden acumularse en la luz del intestino grueso hasta el rango milimolar donde, junto con los conjugados excretados en la luz intestinal a través de la bilis, se someten a las actividades enzimáticas del intestino microbiano comunidad.

3.17 Actividad antioxidante de los polifenoles ⁽¹⁵⁾

El creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica. Pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres. Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones. Otras actividades que merecen ser destacadas son sus acciones antivirales y antialérgicas, así como sus propiedades antitrombótica y antiinflamatoria. Los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides, son:

- Presencia de estructura O-dihidroxi en el anillo B; que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.
- Doble ligadura, en conjunción con la función 4- oxo del anillo C41-42
- Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante.

3.18 Papel de los polifenoles en la salud.

Durante los últimos años ha sido creciente el interés por el uso de productos naturales como polifenoles, que por sus propiedades antioxidantes han

demostrado efectos quimio protectores contra el fotodaño producido por radiación UV, incluida cáncer de piel.⁽³⁰⁾

Los polifenoles pueden interferir distintas etapas que conducen al desarrollo de tumores malignos al proteger al ADN del daño oxidativo, inactivando los carcinógenos e inhibiendo los genes mutagénicos de la actividad de las enzimas encargadas de la activación de procarcinogenos.

Diferentes estudios epidemiológicos han puesto en evidencia el efecto preventivo de los polifenoles frente al cáncer de vejiga, así como frente a otros tipos de canceres, como el de pulmón, aunque en algunos casos los resultados obtenidos pueden no ser concluyentes o ser contradictorios.⁽¹⁸⁾

Como consecuencia de su acción antioxidante, los polifenoles poseen efectos vasodilatadores, antitrombóticos, antiinflamatorios y anti apoptóticos. Además de las propiedades vasodilatadoras que favorecen el control del tono arterial, se han descrito otras propiedades de los polifenoles que favorecen también su efecto cardioprotector, antilipémicos y anti-aterogénicos. Habría además que señalar, que algunos estudios han demostrado que estos compuestos también pueden inhibir la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), y la inhibición de esta enzima justificaría también sus efectos vasodilatadores y cardioprotectores. Estudios de laboratorio sugieren que el estrés oxidativo puede contribuir a la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Por tanto, se ha hipotetizado que el riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer podría reducirse por el consumo de antioxidantes que contrarresten el efecto negativo del estrés oxidativo.⁽¹⁵⁾

3.19 Fundamento de extracción por Ultrasonido ⁽¹⁾

La extracción con disolventes es la técnica de separación de compuestos más utilizada no solo en los laboratorios de química sino también en las diversas industrias. La técnica consiste en que, a partir de una matriz sólida o líquida, aprovechando las diferencias de solubilidad de los componentes de la mezcla,

separarlos con un disolvente adecuado; tradicionalmente, la extracción de estos compuestos de interés se ha realizado mediante técnicas convencionales donde se emplean solventes como: agua, metanol, etanol, acetato de etilo, entre otros; obteniendo un bajo rendimiento del proceso. Por definición el ultrasonido es un tipo especial de vibración de onda de sonido con frecuencia más allá de la audición humana (20000 Hz), es decir, a más de 20 KHz., y de acuerdo con el centro de soniquímica de la Universidad de Coventry en el Reino Unido el ultrasonido puede ser dividido en dos tipos: ultrasonido de señal y de potencia.

3.19.1 Ultrasonido de señal

En el ultrasonido de señal el rango de frecuencia de las ondas se sitúa en el rango de 100 KHz hasta 1 Mhz, conocido también como ultrasonido de baja frecuencia; esta señal es afectada por los elementos que entran en contacto con ella, permitiendo de esta manera obtener información acerca del producto, principalmente en el estudio de sus propiedades reológicas.

3.19.2 Ultrasonido de potencia

En el ultrasonido de potencia el rango de frecuencia de las ondas se sitúa desde 18 KHz hasta 100 KHz, conocido también como ultrasonido de alta frecuencia; al haber una frecuencia más baja y una potencia más alta se logran producir cambios fisicoquímicos en el medio a través de la generación y subsiguiente colapso de burbujas de cavitación (fenómeno donde las ondas de sonido que pasan a través de un medio (solvente) generan procesos de compresión y de expansión), significa que la producción, el crecimiento y el colapso de burbujas es debido a una gran cantidad de energía que se puede producir a partir de la conversión de energía cinética de movimiento esto ocurre asimétricamente en las interfaces y golpes sobre la superficie sólida. Para lograr el efecto antes mencionado se requiere de un medio líquido (agua, u otro), un generador de energía y un transductor, el cual convierte la energía eléctrica, magnética o

cinética en energía acústica. (ver figura N°9)

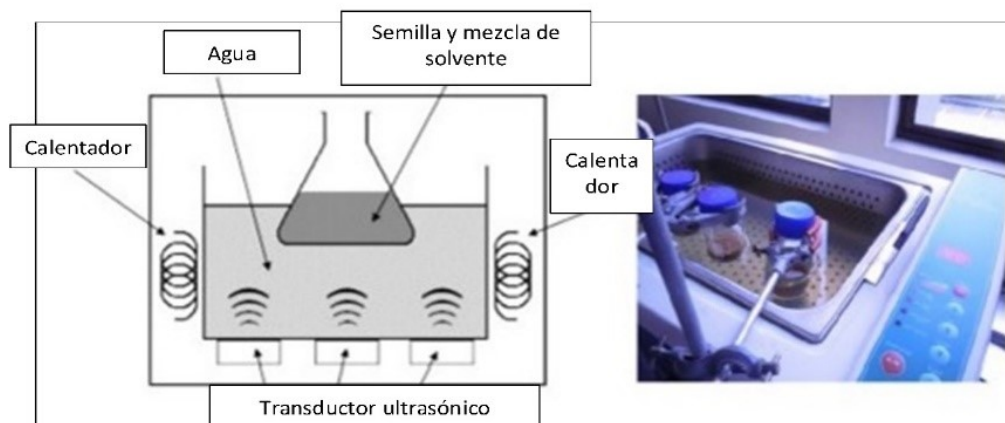


Figura N°9. Extracción por Ultrasonido ⁽¹⁾

3.20 Determinación de actividad antioxidante utilizando el método DPPH

Se conoce así a la técnica que emplea el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo como radical. El DPPH es un radical libre que se puede obtener directamente disolviendo el reactivo en un medio orgánico. La reducción del DPPH se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica. En su forma de radical libre, el DPPH absorbe a 515 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece.

En consecuencia, la desaparición del DPPH proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atacar radicales. El modelo que explica la actividad de un compuesto como anti radical se simplifica de la siguiente manera:



Donde AH es un antioxidante que actúa como anti radical donando átomos de hidrogeno, dando como resultados radicales con estructuras moleculares estables que detendrán la reacción en cadena, el nuevo radical formado (A)

puede interactuar con otro radical para formar moléculas estables (DDH-A, A-A).

Cuando se mezcla con una sustancia que puede donar uno o varios átomos de hidrogeno, la concentración del radical DPPH disminuye mientras aparece la forma reducida DPPH-H provoca un cambio de color morado a amarillo y la absorbancia de la solución decrece.

El empleo del radical DPPH en el método espectrofotométrico posee ventajas en cuanto a la simplicidad, confiabilidad, reproductibilidad y rapidez para la determinación de actividad antioxidante.

3.21 Espectroscopia UV-visible ⁽¹⁰⁾

La radiación ultravioleta (UV) y visible comprende solo una pequeña parte del espectro electromagnético, que incluye otras formas de radiación como radio, infrarrojo (IR), cósmica y rayos X. (Ver figura N°10).

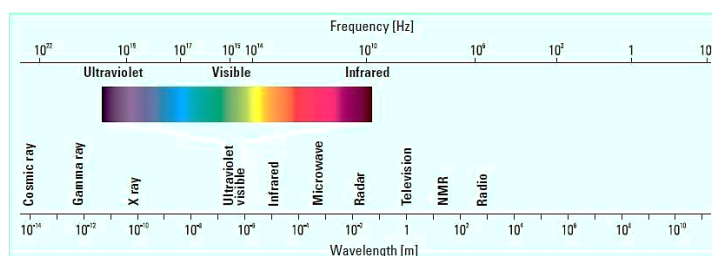


Figura N°10. Espectro electromagnético. ⁽¹⁰⁾

La energía asociada con la radiación electromagnética se define por la siguiente ecuación:

$$E = h\nu$$

Donde **E** es la energía (en julios), **h** es la constante de Planck (6.62×10^{-34} Js) y **ν** es la frecuencia (en segundos).

La radiación electromagnética puede considerarse una combinación de campos

eléctricos y magnéticos alternos que viajan por el espacio con un movimiento de onda. Como la radiación actúa como una onda, puede clasificarse según la longitud de esta o la frecuencia, relacionadas por:

$$v = c/\lambda$$

donde v es la frecuencia (en segundos), c es la velocidad de la luz ($3 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$) y λ es la longitud de onda (en metros). En espectroscopía UV-visible, la longitud de onda normalmente se expresa en nanómetros ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). De las ecuaciones anteriores se deduce que radiación con longitud de onda más corta tiene mayor energía. En espectroscopía UV-visible, la luz UV de longitud de onda más pequeña tiene la energía más alta. En algunos casos, esta energía es suficiente para causar reacciones fotoquímicas no deseadas al medir los espectros.

Como la luz es una forma de energía, la absorción de la luz por la materia causa que aumente el contenido de energía de las moléculas (o átomos). La energía potencial total de una molécula, generalmente se representa como la suma de sus energías electrónica, vibracional y rotacional:

$$E_{\text{total}} = E_{\text{electronica}} + E_{\text{vibracional}} + E_{\text{rotacional}}$$

La cantidad de energía que una molécula posee en cada forma no es un continuo, sino una serie de niveles o estados discretos. La diferencia de energía entre los diferentes estados sigue el orden:

$$E_{\text{electronica}} > E_{\text{vibracional}} > E_{\text{rotacional}}$$

En algunas moléculas y átomos, los fotones de luz UV y visible tienen suficiente energía para causar transiciones entre los diferentes niveles. La longitud de onda de la luz absorbida es aquella que tiene la energía requerida para mover un electrón desde un nivel de energía inferior a uno superior. La figura N°11 muestra

un ejemplo de transiciones electrónicas en el formaldehído y las longitudes de onda de la luz que las causan.

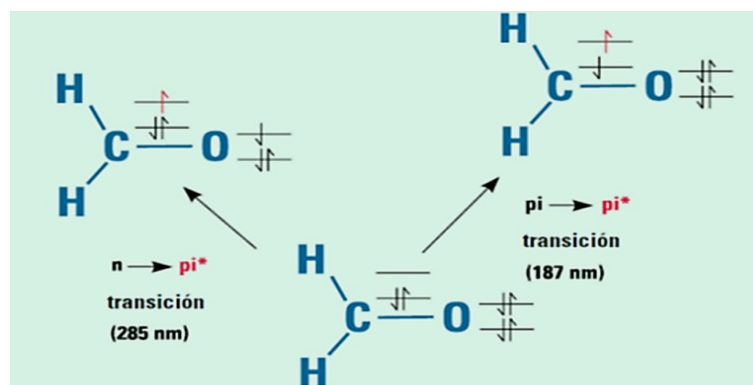


Figura N°11. Transiciones electrónicas en el formaldehído ⁽¹⁰⁾

Estas transiciones deben resultar en bandas de absorción muy estrechas, a longitudes de onda características de la diferencia entre los niveles de energía de las especies absorbentes (Ver figura N°12).

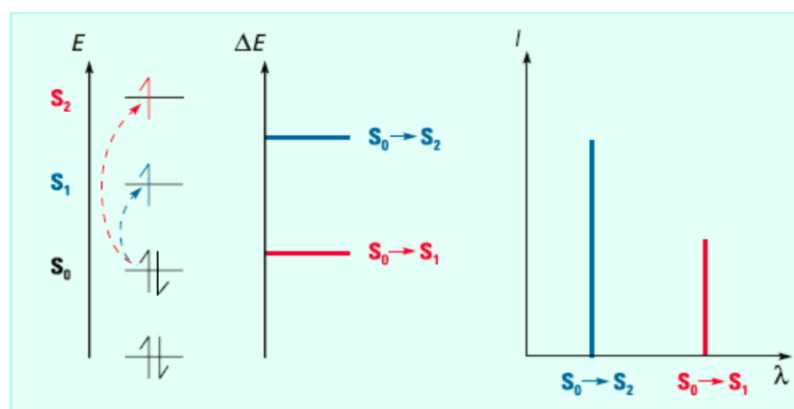


Figura N°12. Transición electrónica y espectros de los átomos ⁽¹⁰⁾

3.22 Espectrofotómetro UV-visible ⁽⁹⁾

La región UV se define como el rango de longitudes de onda de 195 a 400 nm, es una región de energía muy alta, provoca daño al ojo humano, así como quemadura común. Los compuestos con dobles enlaces aislados, triples enlaces, enlaces peptídicos, sistemas aromáticos, grupos carbonilos y otros heteroátomos tienen su máxima absorbancia en la región UV, por lo que ésta es muy importante para la determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos orgánicos.

Diversos factores como pH, concentración de sal y el disolvente que alteran la carga de las moléculas, provocan desplazamientos de los espectros UV. La fuente de radiación ultravioleta es una lámpara de deuterio.

En la región visible apreciamos el color visible de una solución y que corresponde a las longitudes de onda de luz que transmite, no que absorbe. El color que absorbe es el complementario del color que transmite. Por tanto, para realizar mediciones de absorción es necesario utilizar la longitud de onda en la que absorbe luz la solución coloreada.

La fuente de radiación visible suele ser una lámpara de tungsteno y no proporciona suficiente energía por debajo de 320 nm. Todos los espectrofotómetros constan de:

- Fuente de energía radiante: lámpara de deuterio y tungsteno.
- Un monocromador para la selección de radiaciones de una determinada longitud de onda: filtros, prismas, redes de difracción.
- Un compartimento donde se aloja un recipiente transparente (cubetas o tubos) que contenga la muestra, pueden ser de vidrio, cuarzo o plástico transparente. Para medir en UV se deben usar las de cuarzo o sílice fundido, porque el vidrio no transmite la radiación UV.

- Un detector de luz y un amplificador convertidor de las señales luminosas en señales eléctricas.
- Un registrador o sistema de lectura de datos. (Ver figura N°13).

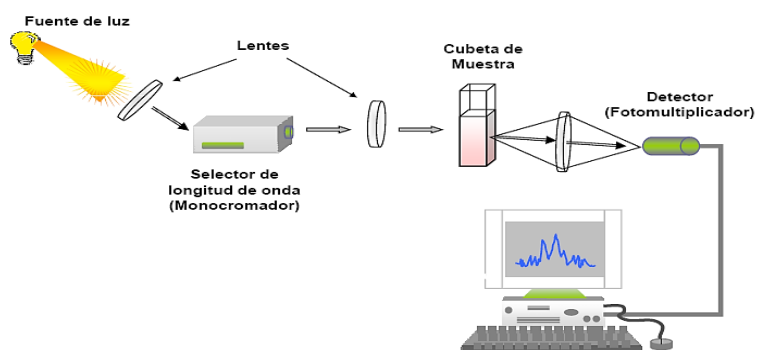


Figura N°13. Espectrofotómetro ⁽⁹⁾

3.23 Transmitancia y Absorbancia ⁽¹²⁾

Cuando un rayo de luz de una determinada longitud de onda de intensidad I_0 incide perpendicularmente sobre una disolución de un compuesto químico que absorbe luz o cromóforo, el compuesto absorberá una parte de la radiación incidente (I_a) y dejará pasar el resto (I_t), de forma que se cumple: $I_0 = I_a + I_t$

La transmitancia (T) de una sustancia en solución es la relación entre la cantidad de luz transmitida que llega al detector una vez que ha atravesado la muestra, I_t , y la cantidad de luz que incidió sobre ella, I_0 , y se representa normalmente en tanto por ciento: $\%T = I_t/I_0 \times 100$

La transmitancia nos da una medida física de la relación de intensidad incidente y transmitida al pasar por la muestra. La relación entre %T y la concentración no es lineal, pero asume una relación logarítmica inversa.

La absorbancia (A) es un concepto más relacionado con la muestra puesto que nos indica la cantidad de luz absorbida por la misma, y se define como el

logaritmo de $1/T$, en consecuencia: $A = \log \frac{1}{T} = -\log T = -\log l_t l_0$

Cuando la intensidad incidente y transmitida son iguales ($I_0 = I_t$), la transmitancia es del 100% e indica que la muestra no absorbe a una determinada longitud de onda, y entonces A vale $\log 1 = 0$. La cantidad de luz absorbida dependerá de la distancia que atraviesa la luz a través de la solución del Cromóforo y de la concentración de éste.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de estudio

4.1.1 Estudio prospectivo

Por ser el primer estudio realizado en el país, para determinar actividad antioxidante en trilla de café, procedente del beneficiado Honey, además los resultados de esta investigación servirán para futuras investigaciones.

4.1.2 Estudio experimental

En el desarrollo de la investigación se realizaron análisis espectrofotométricos los cuales se efectuaron en Laboratorio de investigación en productos naturales y Laboratorio de análisis bromatológico de la facultad de Química y Farmacia, de la Universidad de El Salvador.

4.2 Investigación bibliográfica:

Con el objetivo de recolectar más información para el desarrollo de esta investigación se consultó las siguientes bibliotecas:

- “Dr. Benjamín Orozco, Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador (UES).”
- Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador (UES).
- Central, de la Universidad de El Salvador
- Internet

4.3 Investigación de campo

La investigación de campo se llevó a cabo en planta industrial IBIZA, Municipio de La Palma, departamento de Chalatenango, se realizó una entrevista al propietario (Ver anexo N°3), para conocer de la historia de la planta Industrial y así mismo obtener información de cómo se realiza el proceso de beneficiado

Honey y sus ventajas con respecto a otros beneficiados; luego se ubicó el sitio de almacenamiento donde se obtuvo la muestra de trilla de café.

Se realizó un muestreo dirigido. De esta manera la acción fue orientada por el Señor Juan Carlos Murcia, donde nos indicó cual era el proceso de trillado recién realizado, y donde se encontraba la muestra almacenada en condiciones adecuadas, para evitar el deterioro de la misma a causa de la humedad; la trilla la utilizan como abono orgánico en una época del año; en el que el caficultor realiza el trillado del café; se recolectó la muestra de trilla en abril de 2019, donde se encontraba almacenada en una bolsa de nylon blanca.

4.3.1 Recolección de muestra de Trilla de café honey. (Ver anexo N°4)

- Nos trasladamos al lugar de recolección de muestra, ubicado en finca industrial Ibiza, municipio de La Palma, departamento de Chalatenango.
- Después de dar un breve recorrido por el lugar, el propietario de la finca indicó el sitio de recolección de la muestra, la cual se encontraba en una bolsa de nylon color blanco.
- Utilizando guantes, se tomó de la bolsa de nylon 100 g de la muestra de trilla de café honey, pesados en una balanza granataria y se colocó en tres bolsas de cierre hermético de 3 libras debidamente identificadas.

4.3.2 Transporte y almacenamiento de la muestra de trilla de café honey. (Ver anexo N°5):

- La muestra de trilla se almacenó en hieleras para su respectivo transporte y así evitar su deterioro.
- Se trasladó la muestra de trilla de café honey al Laboratorio de análisis bromatológico, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador. lugar donde se almaceno hasta su respectivo analisis.

- Se utilizó la muestra fresca y se guardó en refrigeración entre 15°C y 20°C

4.3.3 Universo y muestra

- **Universo:** Constituido por *Coffea arábica* (café) cultivado del beneficiado Honey.
- **Muestra:** Trilla de café procedente del beneficiado Honey, Planta Industrial IBIZA, Caserío el Zarzal, Cantón El Gramal del municipio La Palma, Chalatenango.
- **Muestreo:** Dirigido, intencional o por conveniencia. ⁽²⁰⁾

4.4 PARTE EXPERIMENTAL

4.4.1 Material, Equipo y Reactivos (Ver anexo N°6)

4.4.2 Preparación de la muestra de trilla de café honey antes de la extracción (Ver anexo N°7):

- En la preparación de la muestra se realizó una mezcla de todo el contenido recolectado en las tres bolsas.
- Se micronizó la muestra de trilla de café honey, utilizando una licuadora con aspas de acero inoxidable a velocidad 1 (2500 a 3000 rpm).
- Se tamizó la muestra de trilla, para la obtención de partículas más finas.
- Se almacenó en un desecador.

4.4.3 Preparación de las mezclas de solventes para la extracción de metabolitos (Ver anexo N°8).

- Se preparó una mezcla hidroalcohólica 50:50
- Se agregó en un balón volumétrico de 500 mL debidamente rotulado, 250 mL de etanol previamente medido con una probeta de 500 mL y se llevó a volumen

con agua purificada.

- Se preparó una mezcla hidroalcohólica de 70:30
- Se agregó en un balón volumétrico de 500 mL previamente rotulado, 150 mL de etanol previamente medido con una probeta de 250 mL y se llevó a volumen con agua purificada.
- Se agregó a un beaker de 500 mL el solvente acuoso, para continuar con el análisis.

4.4.4 Extracción de metabolitos polifenólicos (Ver anexo N°9).

- Para la extracción de metabolitos, se rotularon dos Erlenmeyer de la siguiente manera: mezcla hidroalcohólica MX-1 MX-2 50:50 (Muestra 1 y muestra 2 50:50), mezcla hidroalcohólica MX-1 MX-2 70:30 (Muestra 1 y muestra 2 70:30) solvente acuoso MX-1 MX-2 H₂O (Muestra 1 y muestra 2 solvente acuoso) respectivamente. (Ver anexo N°10)
- En balanza analítica, se pesó 1.25 g de muestra de trilla de café utilizando papel glassine y se agregó a cada uno de los Erlenmeyer rotulados anteriormente. (Ver anexo N°11)
- Con ayuda de una probeta se agregó 50 mL, de mezcla hidroalcohólica 50:50, mezcla hidroalcohólica 70:30 y el solvente acuoso a cada Erlenmeyer rotulado.
- Se encendió el ultrasonido y se programaron las condiciones siguientes: Potencia: 100 W, T: 25°C, Frecuencia: 37 Hz)
- Se colocaron las muestras en el ultrasonido durante 30 minutos.

Nota: Por ser una misma matriz en estudio las muestras se pesaron por duplicado.

4.4.5 Recuperación del extracto (Ver anexo N°12)

- Se filtró al vacío en papel Whatman #42.
- Se pesaron 6 tubos de centrifugado identificados de la siguiente manera: Mezcla hidroalcohólica MX-1 MX-2 50:50, mezcla hidroalcohólica 70:30 MX-1 MX-2 70:30 y el solvente acuoso MX-1 MX-2 H₂O.
- Se agregó 35 mL del filtrado a cada tubo de centrifugado identificados para cada mezcla de solventes, obteniendo en total 6 tubos de centrifugado.
- Del laboratorio de análisis bromatológico se trasladaron las muestras al laboratorio de investigación en productos naturales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, debidamente cubiertas de la luz para evitar deterioro de los metabolitos presentes.
- Se concentraron las muestras en equipo Genevac EZ-2 Plus a 45 ° C durante 10 horas a 911 milibar de presión utilizando el método acuoso programado en el equipo.
- Se colocaron las muestras en desecador, y se pesaron hasta obtener un peso constante no mayor de 0.05 g. (ver anexo N°13)

4.4.6 Cuantificación de actividad antioxidante por medio del método DPPH.

4.4.6.1 Preparación de la solución del método DPPH 500 µM.

(Ver Anexo N°14)

Para la cuantificación de actividad antioxidante el cual se realizó a través del metodo de DPPH, se requirió la realización de los cálculos pertinentes para determinar asi la cantidad de DPPH suficiente para que este lograra hacer la reacción con el analito.

- Cálculo para obtener 10 mL de DPPH 500 µM

a) $M = (\text{masa} / \text{PM DPPH}) (1 / V \text{ Solvente})$

b) $0.005 = (x / 394.32 \text{ g/mol}) (1 / 0.1\text{L})$

c) $0.019716\text{g} = 19.716 \text{ mg de DPPH}$

- Se pesó exactamente 19.716 mg de DPPH y se agregó a un balón volumétrico de 10 mL y llevó a volumen con metanol.

4.4.6.2 Preparación de soluciones para obtener la curva de calibración con estándar Trolox (Ver Anexo N°15)

- Cálculo para obtener 10 mL de solución madre 500 μM de Trolox

a. $M = (m / \text{PM Trolox}) (1 / V \text{ Solvente})$

b. $0.0005 \text{ M} = (x / 250.29 \text{ g/mol}) (1 / 0.01 \text{ L})$

c. $0.00125145\text{g} = 1.25145 \text{ mg}$

Donde:

M=Molaridad

M=Masa (g)

PM= peso molecular de Trolox

V= Volumen del solvente

- Se pesó exactamente 1.25145 mg de Trolox y se incorporó a un balón volumétrico de 10 mL, se llevó a volumen con agua ultrapura.
- A partir de una solución madre de 500 μM se prepararon 6 concentraciones diferentes de Trolox (250 μM , 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12.5 μM , 6.25 μM , 0 μM).
- Se tomó una alícuota de 500 μL de solución madre, se incorporó a una celda

de plástico y se agregó 500 μL agua ultrapura para obtener una solución de 250 μM .

- Se repitió el procedimiento anterior hasta obtener las demás concentraciones (100 μM , 50 μM , 25 μM , 12.5 μM , 6.25 μM).

4.4.6.3 Preparación de la muestra de extracto recuperado de trilla de café (Ver anexo N°16)

- Se pesó exactamente 20 mg de muestra de extracto recuperado de trilla
- Se agregó a un balón volumétrico de 10 mL y se llevó a volumen con agua ultrapura, esta solución tiene una concentración de 2.00 mg/mL.

4.4.7 Determinación de actividad antioxidante en café Honey. (Ver anexo N°17)

4.4.7.1 Lectura de curva de calibración con estándar Trolox.

- Se encendió el espectrofotómetro y configuró la lectura a 515 nm.
- Se calibró con agua ultrapura verificando la lectura 0.000.
- A 6 celdas de plástico se agregaron 50 μL de las soluciones preparadas a las siguientes concentraciones: 250 μM , 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12.5 μM , 6.25 μM , 0 μM de Trolox respectivamente.
- Se le agregó 950 μL de DPPH a cada una de las celdas de plástico. Se preparó una celda adicional donde se agregó 50 μL de agua ultrapura y 950 μL de DPPH para tener una concentración de 0 μM .
- Se dejó reaccionar durante 45 minutos protegido de la luz.
- Se realizó la lectura de la curva de calibración a 515 nm.

Nota: El proceso de lectura se realizó con luces apagadas para evitar oxidación del reactivo, debido a que es fotosensible.

4.4.7.2 Lectura de las muestras de extracto recuperado de café Honey. (Ver Anexo N°18)

- A 9 celdas de plástico se le agregaron 950 μ L de DPPH y se agregó 50 μ L de muestra de extracto recuperado de trilla de café a partir de mezcla hidroalcohólica 50:50.
- A 9 celdas de plástico se le agregaron 950 μ L de DPPH y se agregó 50 μ L de muestra de extracto recuperado de trilla de café a partir de mezcla hidroalcohólica 70:30.
- A 9 celdas de plástico se le agregaron 950 μ L de DPPH y se agregó 50 μ L de muestra de extracto recuperado de trilla de café a partir de solvente acuoso.
- Se dejó reaccionar durante 45 minutos protegido de la luz.
- La lectura se tomó a una longitud de onda de 515 nm y se obtuvo el siguiente resultado.

Nota. Las lecturas se leen por triplicado protegido de la luz con papel aluminio.

4.5 Diseño estadístico

A los resultados de la determinación de la actividad antioxidante por medio del reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), se realizó un análisis de varianza multifactorial (ANOVA); donde se determinó si existe diferencia significativa entre cada uno de los solventes utilizados para la extracción de polifenoles evaluando así, la importancia de utilizar dichas mezclas para la obtención de actividad

antioxidante.

Este análisis se basa en el enfoque de dar una aproximación simple, lo cual compara las medias aritméticas de los grupos y verificar así la similitud o diferencia de las variables estudiadas.

Además, del análisis estadístico ANOVA se realizó otro análisis estadístico utilizando el método Tukey el cuál; se espera marque el resultado concreto sobre la mezcla más idónea para la actividad antioxidante, y por ende marcan la mayor actividad antioxidante que poseen los metabolitos presentes en la trilla del café, del beneficiado Honey. Este método a diferencia del ANOVA se utiliza para probar todas las diferencias entre medias de tratamientos de una experiencia.

Para darle una mayor robustez al análisis estadístico se realizó un análisis de probabilidad de muestra, reflejado en una gráfica de probabilidad y una prueba de igualdad de varianza para comprobar la igualdad de las varianzas entre las muestras.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS

5.1 Información obtenida de cómo se realiza el beneficiado Honey.

El café Honey se obtiene a través del procesamiento llamado, beneficiado Honey denominado así; porque conserva el mucílago en la superficie de su pergamino y en la corteza del grano después de haber sido procesado por una máquina, este proceso se realiza después de recolectar la uva madura, en el cual se seleccionan los granos con daños físicos y se separa para pasar al despulpado, seguidamente se quita la corteza roja del grano y así se lleva el café ya procesado a las camas secadoras de café a 11° C aproximadamente, obteniendo el grano de café Honey con características fundamentales como la superficie cubierta por completo de mucilago (miel o cristales de miel).

Para la obtención de trilla de café se utiliza una máquina artesanal girada por corriente, esta se almacena en un lugar seco o en costales de nylon para luego ser llevado a los cafetales y así ser utilizado como materia orgánica.

Dentro de las ventajas que se obtienen al realizar el proceso honey con respecto al beneficiado por vía seca y por vía húmeda, es que reduce la contaminación evitando la proliferación de toxinas en el medio ambiente. Además, no se somete al calentamiento; de esta manera se evita el daño colateral al grano y también aumenta la calidad del café, ya que el grano genera un color característico que lo obtiene por la composición de la miel adherida al mucílago, así mismo el sabor del café es diferente con respecto al obtenido a través de los otros beneficiados. Otra ventaja del beneficiado honey en cuanto al beneficiado por vía seca, es que se realiza en camas secadoras bajo un techo de vidrio donde no penetren directamente rayos solares, sino más bien donde se mantenga la temperatura oscilante entre 11°C aproximadamente; caso contrario con el beneficiado por vía seca (el cual debe de realizarse el proceso de secado bajo el sol en patios) y con relación al beneficiado por vía húmeda (en este procedimiento se realiza el

despulpado seguido de la fermentación) donde este requiere abundante agua y un equipo técnico específico para la realización del proceso.

Dentro de las desventajas del beneficiado honey se da en la etapa del despulpado, ya que, si se deja muy gruesa la capa de mucílago, el café sufre daños, además el mucílago (miel) en el grano puede permanecer fresco, y durante un tiempo puede correr el riesgo que dañe el grano porque puede provocar el crecimiento de hongos y levaduras, otra desventaja es que el secado debe de realizarse en época no lluviosa.⁽¹¹⁾

Sin embargo, resulta útil la aplicación del beneficiado honey en la región, ya que no solamente genera ventajas que proporciona calidad y excelencia al producto; sino que además genera mayor ingreso económico al sector cafetalero, en cuanto a los recursos utilizados para realizar el proceso; por lo tanto representa una opción al productor de café de la zona, no solo porque no se emplea agua y se reducen los vertimientos, sino porque ofrece un producto que disminuye costos y puede llegar a significar un mayor precio y mejor ingreso para el caficultor en un mercado especializado y de esta manera utilizar la trilla de café Honey para otro fines.

5.2 Extracción de metabolitos polifenólicos de trilla de café Honey, por medio de una mezcla de solventes utilizando el método ultrasonido.

5.2.1 Preparación de las mezclas de solventes para la extracción de metabolitos. (Ver Anexo N°19).

Previo a realizar la extracción de los metabolitos, se utilizó etanol y agua con los cuales, se prepararon 3 tipos de mezclas de solventes que se utilizaron para realizar el procedimiento, obteniendo así, mezcla hidroalcohólica 50:50, mezcla hidroalcohólica 70:30 y el solvente acuoso; Estudios realizados por Costa y Alves⁽⁵⁾, demuestran la eficacia de una extracción significativamente mayor de polifenoles de una mezcla hidroalcohólica (50% de agua y 50% de etanol), frente

a una de disolvente (100% agua), la mezcla hidroalcohólica (25% de agua y 75% de etanol) o la mezcla hidroalcohólica (75% de etanol y 25% agua).

Conjuntamente demostraron que el etanol es un solvente seguro y por esta razón se empleó para la extracción de metabolitos, además en una mezcla acuosa genera un control en el proceso de extracción a través del equilibrio y la transferencia de masa. ⁽¹¹⁾

5.2.2 Extracción de metabolitos polifenólicos. (ver anexo N° 19)

Se realizó la extracción por ultrasonido puesto que es una tecnología que, según estudios, puede acelerar la transferencia de masa y calor en la extracción; y que ha sido usada con éxito, especialmente en la extracción de productos naturales provenientes de plantas, permitiendo obtenerlos en menor tiempo, reduciendo el consumo de solvente, simplificando la manipulación y la elaboración; evitando de esta manera la degradación de metabolitos sensibles al calor⁽⁵⁾; se programaron las condiciones para continuar con el procedimiento, teniendo en cuenta la temperatura de 25°C, se colocaron los Erlenmeyer que contenían las muestras en el equipo y se programó por 30 minutos.

Cabe mencionar que, por ser una misma matriz en estudio, se realizó la extracción por duplicado para cada mezcla de solvente, así mismo se observó el color café característico concentrado que presenta la mezcla después de la extracción.

Otros estudios realizados por Murthy P, Naidu M. (2012), revelan una mayor concentración de metabolitos polifenólicos en la trilla de café o cáscara plateada hasta un 6% más con respecto a otros subproductos del café como lo son la pulpa, granos verdes etc. ⁽¹⁵⁾, Afirmando su efectividad, al realizar la extracción de metabolitos polifenólicos con la ayuda del aparato Soxhlet a 121°C durante 20 minutos, utilizando solventes como el isopropanol, agua y mezclas de los mismos

en diferentes proporciones como (60:40) respectivamente, Sin embargo; y debido a que esta técnica no es automatizable y a las condiciones económicas acopladas en el país y en el sector cafetalero, se ha planteado, el método de extracción de una forma más útil y convencional de manera que se pueda tener acceso a los materiales a utilizar al momento de la extracción, por otro lado y tomando en cuenta que a temperaturas más altas se produce la descomposición térmica de los analitos termolábiles, ya que la temperatura del disolvente orgánico está próxima a su punto de ebullición utilizando el aparato Soxhlet; puede afectar la actividad antioxidante al momento de realizar la extracción obteniendo rendimientos más bajos que los comparados con el método por ultrasonido.⁽¹¹⁾

Según los resultados obtenidos por investigaciones, el contenido máximo de compuestos fenólicos es 1.42909 g al ser extraído utilizando una relación líquido-sólido de 11.65 mL/g, con solución de etanol al 21.03%, en comparación con los resultados al alcohol isopropílico que fueron más bajos para la extracción de compuestos fenólicos siendo este de 0.94252g mediante un proceso de extracción asistido por ultrasonido durante 30 min; de esta manera se determinó el efecto de las variables independientes sobre el contenido de compuestos fenólicos de subproductos del café de la variedad *arábica*, siendo la relación líquido-sólido y el tiempo de extracción las variables más influyentes.

Los resultados de este estudio indican que los granos de café son una fuente potencial de compuestos fenólicos que pueden recuperarse fácilmente. Se demostró que el etanol y las soluciones hidroalcohólicas son un disolvente adecuado para la extracción de compuestos fenólicos debido a su alta polaridad, además se determinó que el uso de ultrasonido mejora la extracción obteniendo mayor rendimiento comparado con métodos convencionales.

5.2.3 Recuperación del extracto. (ver anexo N°19)

Se concentraron las muestras en el equipo Genevac EZ-2 plus, eliminando el agua y el solvente orgánico presente en las muestras, posteriormente se obtuvo como resultado un producto en estado sólido, con una consistencia untuosa, color café oscuro y aroma característico. El color y el aroma lo determina el tipo de café que se utiliza, en este caso el café Honey tiene aroma a miel y color característico café, que le ha proporcionado a la trilla de café durante el procedimiento de obtención en el beneficiado Honey.

En vista de que una de las alternativas para resolver la crisis, es la diversificación de la actividad cafetalera, la cual pretende lograrse mediante la agregación de valor en uno de los eslabones de la cadena productiva, específicamente en el beneficiado; así de esta manera, adecuar métodos que resulten útiles, económicos y al alcance del sector cafetalero; por lo tanto en vista que el método evaporativo directo utilizando el equipo Genevac EZ-2 plus ofrece ventajas distintas eliminando el paso de la limpieza de la muestra, perfeccionando reproductibilidad, la duración de análisis que es reducida y ser de poco costo. Además, del manejo mínimo de la muestra se requiere usando la metodología evaporativa directa, esto reduce el riesgo de contaminación cruzada y de evitar el desperdicio del analito; a diferencia de utilizar el liofilizador; otros estudios indican que es efectivo aplicar esta metodología debido a que mantiene mejor la estructura y aspecto original de las muestras de origen natural como el café; sin embargo es un método muy costoso debido a que es de alto coste energético y elevado tiempo de proceso, además de ser necesaria una gran inversión de equipamiento.

Después de realizar el procedimiento de evaporación del solvente, utilizando el equipo Genevac; se colocaron los tubos de centrifugado en un desecador durante un tiempo prolongado, con el fin de mantenerlos libres de humedad, donde se monitoreo el peso de los tubos de centrifugado hasta que el peso fue constante con el propósito de obtener datos uniformes y genuinos. (Ver anexo N°13).

5.3 Cuantificación de la actividad antioxidante del extracto obtenido utilizando el reactivo 2,2-difenil1-picril hidrazilo (DPPH). (Ver anexo N°19).

5.3.1 Preparación de la solución del método DPPH 500 µM.

Para realizar la cuantificación de la actividad antioxidante presente en la trilla de café, se preparó la solución DPPH, reactivo que se utiliza para determinación de la actividad antioxidante presente en muestras que contienen polifenoles totales; el empleo de este en el método espectrofotométrico posee ventajas en cuanto a simplicidad, confiabilidad y reproducibilidad, se obtuvo una solución con una concentración de 500 µM color violeta, esta coloración es debida a la presencia de radicales libres.

El DPPH es uno de los pocos radicales orgánicos nitrogenados estables disponibles comercialmente. Su reducción hace que el color de su solución se desvanezca, comportamiento que es aprovechado para monitorear el progreso de la reacción a través de un espectrofotómetro UV-VIS. Este procedimiento es de uso frecuente para medir la actividad antioxidante de extractos vegetales.⁽¹¹⁾

5.3.2 Preparación de soluciones para curva de calibración con estándar Trolox.

Para la preparación del estándar Trolox que en virtud de su alta solubilidad en agua y su amplia disponibilidad comercial; el Trolox es universalmente empleado como estándar en las curvas de comparación de diversos ensayos de actividad antioxidante⁽⁸⁾ este, se utilizó para la curva de calibración.

5.3.3 Determinación de actividad antioxidante de trilla de café Honey.

Las muestras se analizaron en el Laboratorio de Investigación en productos naturales, de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, por el método de espectroscopia UV-Visible utilizando el equipo

Genesis 10S UV-Vis y el software VISIONlite en un período comprendido de junio a Julio del año 2019.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla N°4:

Tabla N°4. Resultados de curva de calibración del estándar Trolox

Concentración	Absorbancia
250.00 μM	0.299
100.00 μM	0.465
50.00 μM	0.523
25.00 μM	0.550
12.50 μM	0.561
6.25 μM	0.566
0.00 μM	0.570

Se observa dos columnas, la concentración expresada en micromoles (μM) y las absorbancias obtenidas a diferentes concentraciones utilizando el reactivo Trolox como estándar permitió calcular las concentraciones obtenidas en las muestras, para calcular dichos parámetros se utilizó una curva de calibración reflejada en la Figura N°14.

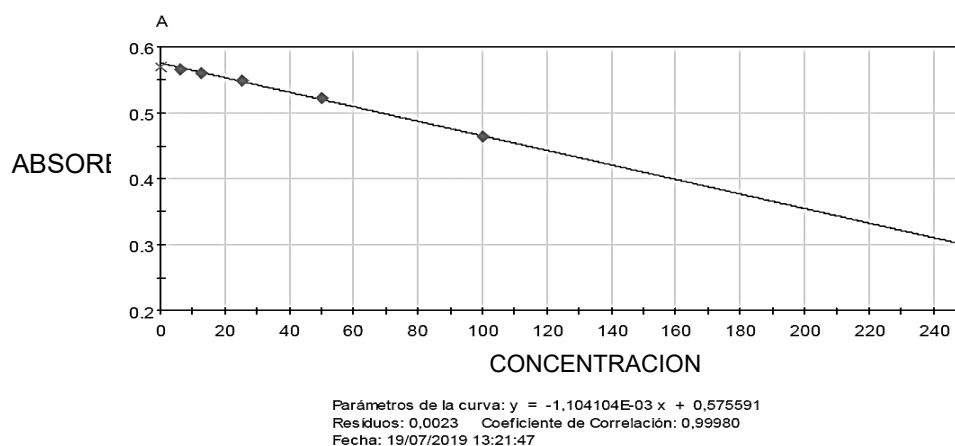


Figura N°14. Gráfico de curva de calibración del estándar Trolox.

La Figura N°14 muestra la curva de calibración que indica la relación

directamente proporcional entre la concentración y las absorbancias obtenidas, esto señala que entre menor sea la absorbancia obtenida mayor será la concentración; por otra parte, por medio de la calibración se obtuvo el parámetro de la curva expresada por la siguiente ecuación: $y = -0.001104104x + 0.575591$, que se utilizó para conocer la concentración real de las lecturas tomadas en las muestras, además el coeficiente de correlación el cual es de 0.99980 señala que, el conjunto de puntos representados se aproxima a una recta lineal.

Estudios realizados por Kuskoski y Asuero reflejan que los métodos más aplicados son ABTS (ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y DPPH. Ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias. El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio), enzimática (peroxidasa, mioglobulina), o también electroquímica. Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico. El radical ABTS tiene, además, la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico, mientras que el DPPH presenta un pico de absorbancia a 515 nm. (13)

Posterior a la lectura de la curva de calibración se realizó la lectura de las muestras de extracto recuperado de trilla de café honey; a 9 celdas de plásticos se le agregó 950 μL de DPPH y se agregó 50 μL de muestra de extracto recuperado de trilla de café honey obtenido a partir de la mezcla hidroalcohólica 50:50, se realizó el mismo procedimiento para la muestra de extracto recuperado de trilla de café honey obtenido a partir de la mezcla hidroalcohólica 70:30 de igual manera para la muestra obtenida a partir del solvente acuoso, obteniendo los resultados reflejados en la tabla N°5. Se dejó reaccionar durante 45 minutos (tiempo estimado en el que se realiza la reacción de una sustancia que posee

antioxidantes y que al combinarse con el radical DPPH, esta sustancia pueda donar uno o varios átomos de hidrogeno y así la concentración del radical DPPH disminuye, mientras aparece la forma reducida DPPH-H provocando un cambio de color de morado a amarillo) indicando de esta manera la presencia de antioxidantes en la trilla de café Honey. (ver anexo 19)

Tabla N°5. Resultados de absorbancias y concentración obtenidos en la determinación de actividad antioxidante en muestras de trilla de café honey.

MUESTRA HIDROALCOHOLICA 70:30		
muestra	absorbancia	Concentración de actividad antioxidante
70:30 MX 1-1	0.554	19.74 μM
70:30 MX 1-2	0.552	21.19 μM
70:30 MX 1-3	0.561	13.67 μM
Promedio primera lectura	0.556	18.20 μM
70:30 MX 2-1	0.561	10.95 μM
70:30 MX 2-2	0.555	18.92 μM
70:30 MX 2-3	0.556	17.38 μM
Promedio segunda lectura	0.557	15.73 μM
MUESTRA HIDROALCOHOLICA 50:50		
muestra	absorbancia	Concentración de actividad antioxidante
50:50 MX 1-1	0.551	22.73 μM
50:50 MX 1-2	0.551	22.18 μM
70:30MX 1-3	0.556	29.70 μM
Promedio primera lectura	0.553	24.87 μM
50:50 MX 2-1	0.538	33.87 μM
50:50 MX 2-2	0.539	33.50 μM
50:50 MX 2-3	0.538	33.77 μM
Promedio segunda lectura	0.538	33.71 μM

Tabla N°5. Continuación

MUESTRA SOLVENTE ACUOSO		
muestra	absorbancia	Concentración de actividad antioxidante
H ₂ OMX 1-1	0.556	18.11 µM
H ₂ OMX 1-2	0.560	14.57 µM
H ₂ OMX 1-3	0.556	18.02 µM
Promedio primera lectura	0.557	16.90 µM
H ₂ OMX 2-1	0.551	22.54 µM
H ₂ OMX 2-2	0.551	22.00 µM
H ₂ OMX 2-3	0.556	18.02 µM
Promedio de segunda lectura	0.553	20.85 µM

El DPPH es un método opcional para cuantificar la actividad antioxidante de la trilla de café Honey, por lo que se ha utilizado un método de espectrofotometría UV Visible que se adapta a las disposiciones económicas, del sector cafetalero en El Salvador y que de igual manera se obtengan resultados confiables.

Los resultados expresados en la Tabla N°5 reflejan las absorbancias obtenidas leídas a 515 nm en espectrofotómetro UV-VIS, junto con las concentraciones obtenidas por medio de la regresión lineal de la curva de calibración del estándar Trolox. Se observa que al realizar las lecturas por triplicado, el promedio de la concentración de actividad antioxidante de la muestra que se extrajo con la mezcla hidroalcohólica 70:30; es de 18.20 µM para la primera lectura, y el promedio de la segunda lectura es de 15.73 µM; el promedio de concentración de actividad antioxidante de la muestra que se extrajo con mezcla hidroalcohólica 50:50 es de 24.87 µM para la primera lectura, y de 33.71 µM para la segunda lectura y los resultados de los promedios de las concentraciones de actividad antioxidante para las muestras que se extrajeron con solvente acuoso son de 16.9 µM para la primera lectura, y de 20.85 µM para las segundas lecturas; determinando que las que tienen mayor concentración de actividad antioxidante

es la mezcla hidroalcohólica 50:50; estudios anteriores revelan que la actividad antioxidante encontrada en la trilla del café, proveniente de la especie *Coffea arabica*, puede ser explicada y analizada si se tiene en cuenta que en dicha capa del fruto del café, parte de los compuestos polifenólicos que están presentes en el grano se conservan. La selección del solvente utilizado en la investigación, se basa en la concentración obtenida en el extracto, el porcentaje de recuperación del solvente y el tiempo empleado en la extracción, utilizando el ultrasonido como equipo de extracción y el rotavapor para concentrar las muestras de cascarilla de café, tomando en cuenta que el estándar base es el ácido gálico en el cual se obtuvieron las siguientes concentraciones para el Etanol 200 mg de Ácido gálico/L, para el metanol 122 mg de Ácido gálico/L, Acetona 89.17 mg de Ácido gálico/L y el isopropanol 83.3 mg de Ácido gálico/L; determinando así que los residuos generados en la producción de café son fuentes potenciales de sustancias que pueden ser aprovechadas en la industria química o alimentaria como antioxidantes.⁽²⁰⁾

5.4 Evaluación estadística de los resultados.

Para determinar si existe diferencia significativa entre la mezcla de solventes utilizadas (mezcla hidroalcohólica 50:50, mezcla hidroalcohólica 70:30 y solvente acuoso) utilizadas para la extracción de metabolitos en la trilla del café del beneficiado honey, se realizó por medio de los métodos estadísticos ANOVA y Tukey.⁽¹³⁾ Utilizando del programa Minitab, se obtuvo la gráfica de probabilidad indicada en la Figura N°15, que sirvió para verificar si los datos siguen una distribución de probabilidad específica, para ello se compararon los datos que arroja el valor p con el nivel de significancia (0.05), el cual indica que el riesgo de concluir que los datos no siguen una distribución normal es del 5%, si el valor de p es menor a 0.05 sugerirá que los datos no siguen una distribución normal, por lo cual los datos obtenidos indican que tanto para las muestras de mezcla hidroalcohólica 50:50, mezcla hidroalcohólica 70:30 y solvente acuoso se obtiene un valor p mayor a 0.05, obteniendo un valor p de 0.060 para mezcla

hidroalcohólica 50:50, 0.509 para mezcla hidroalcohólica 70:30, 0.206 para solvente acuoso, por lo que, las muestras siguen una distribución normal respectivamente.

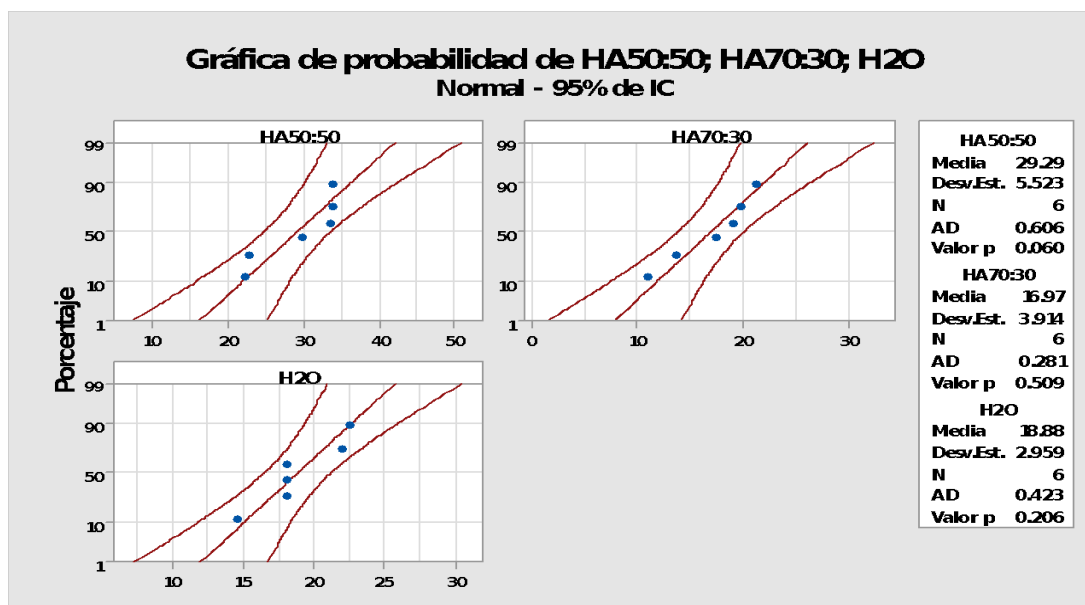


Figura N°15. Gráfica de probabilidad de muestras de mezcla hidroalcohólica 50:50, mezcla hidroalcohólica 70:30 y solvente acuoso.

5.4.1 Prueba de igualdad de varianzas

Se utilizó esta prueba para comprobar la igualdad de las varianzas entre los datos de las muestras, para que no presente interferencia en el análisis ANOVA, para ello se planteó las siguientes hipótesis:

- **Hipótesis nula** Todas las varianzas son iguales
- **Hipótesis Alternativa** Por lo menos una varianza es diferente
- **Nivel de significancia** $\alpha = 0.05$

La Figura N°16 muestra el valor de p de la prueba de comparaciones múltiples y prueba de Levene (presentado automáticamente por el programa Minitab), es mayor que el de nivel de significancia de 0.05, es decir que todos los intervalos

de comparación se superponen y no hay diferencia significativa entre las varianzas de las muestras.

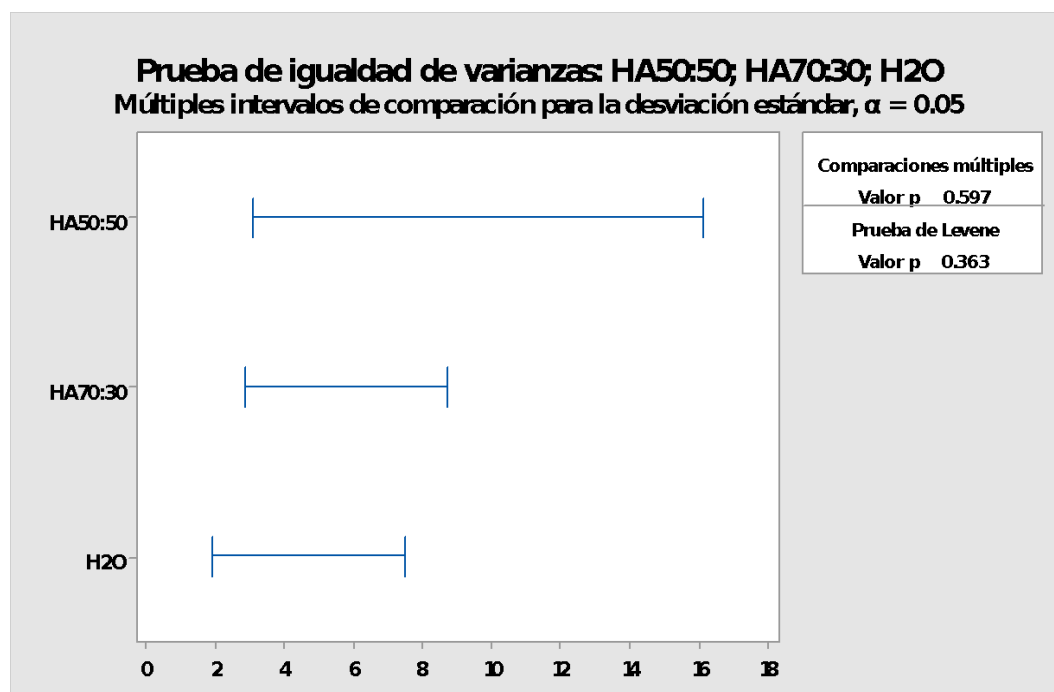


Figura N°16. Gráfico de prueba de igualdad de varianzas para mezcla hidroalcohólica 50:50, mezcla hidroalcohólica 70:30 y solvente acuoso.

5.4.2 Método de análisis ANOVA.

5.4.2.1 ANOVA de un solo factor con tres variables

Para el desarrollo del análisis estadístico de la investigación se plantearon las siguientes hipótesis:

Hipótesis nula: No existe una diferencia significativa en la concentración de actividad antioxidante utilizando mezcla hidroalcohólica 50:50, mezcla hidroalcohólica 70:30 y solvente acuoso como medio de extracción a un P nivel de significancia mayor a 0.05 (P=5%).

Hipótesis alterna: Existe una diferencia significativa en la concentración de actividad antioxidante utilizando mezcla hidroalcohólica 50:50, mezcla

hidroalcohólica 70:30 y solvente acuoso como medio de extracción a un P de nivel de significancia menor a 0.05 (P=5%).

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

En La Tabla N°6 muestra el factor que indica la especie en estudio (trilla de café Honey), la cual se sometió a una extracción con 3 diferentes mezclas que señala el nivel en la tabla de información.

Tabla N°6. Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	3	HA50:50; HA70:30; H ₂ O

En la tabla N°7 se indica los resultados del método estadístico ANOVA, donde se refleja que el valor p obtenido 0.0003125 es menor al nivel de significancia de 0.05; por consiguiente, Minitab utiliza el valor F para calcular el valor p, que se usa para tomar una decisión acerca de la significancia estadística de los términos y el modelo. El valor p es una probabilidad que mide la evidencia en contra de la hipótesis nula. Las probabilidades más bajas proporcionan una evidencia más fuerte en contra de la hipótesis nula.

Un valor F suficientemente grande indica que el término o el modelo es significativo; por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula, indicando que no existe diferencia significativa de actividad antioxidante entre las mezclas hidroalcohólica 50:50, mezcla hidroalcohólica 70:30 y solvente acuoso, y se acepta la hipótesis alternativa la cual expresa que existe diferencia significativa de actividad antioxidante entre la mezcla hidroalcohólica 50:50, mezcla hidroalcohólica 70:30 y solvente acuoso. Por ende, el valor F entre más grande es su valor ayuda a respaldar el valor p de rechazar la hipótesis nula.

Tabla N°7. Resultados de método Análisis de Varianza

Fuente	Grado de Libertad	Valor F	Valor p
Factor	2	14.50	0.0003125
Total	17	N/A	N/A

En la tabla N°8 se presentan los resultados del método estadístico ANOVA donde: El factor muestra cada una de las mezclas en estudio, N niveles en estudio por factor, indican que existe una diferencia significativa en la actividad antioxidante en cada una de las mezclas extraídas, en las que se observa que el resultado mayor de actividad antioxidante obtenida en la extracción se encuentra en la mezcla hidroalcohólica 50:50, ya que alcanza un índice de confianza (IC) de 95% de (25.58; 33.00).

Según el resultado de las desviaciones estándar, se determina que la mezcla hidroalcohólica 50:50 (HA50:50) con el dato de 5.52, presenta una mayor variabilidad de actividad antioxidante a diferencia de los factores de la mezcla hidroalcohólica 70:30 (HA70:30) y solvente acuoso (H₂O), los cuales reflejan una desviación estándar de 3.91 y 2.96 respectivamente, determinando así que los datos de concentraciones obtenidas en la extracción para la mezcla hidroalcohólica 70:30 y los datos de concentración de actividad antioxidante obtenidos en solvente acuoso no varían tanto entre sí, como los comparados con los datos de extracción obtenidos en la mezcla hidroalcohólica 50:50 así, el resultado según el método estadístico ANOVA rechaza la hipótesis nula donde no existe una diferencia significativa en la concentración de actividad antioxidante utilizando mezcla hidroalcohólica 50:50, mezcla hidroalcohólica 70:30 y solvente acuoso como medio de extracción a un P nivel de significancia mayor a 0.05 y acepta la hipótesis alternativa donde existe una diferencia significativa en la concentración de actividad antioxidante utilizando mezcla hidroalcohólica 50:50, mezcla hidroalcohólica 70:30 y solvente acuoso como medio de extracción a un P de nivel de significancia menor a 0.05.

Tabla N°8. Resultado de las medias obtenidas en análisis ANOVA

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
HA50:50	6	29.29	5.52	(25.58; 33.00)
HA70:30	6	16.97	3.91	(13.26; 20.69)
H ₂ O	6	18.88	2.96	(15.17; 22.59)

Desv.Est. agrupada = 4.26525

La Figura N°17. muestra el intervalo de confianza (IC) de 95% para cada una de las mezclas, la mezcla hidroalcohólica 50:50 tiene la media más alta de 29.29% con un intervalo de confianza de (25.58%; 33.00%) y la mezcla 70:30 tiene la media más baja de 16.97% con un IC de (13.26; 20.69), mientras que el solvente acuoso tiene una media de 18.88% y su intervalo de confianza es de (15.17%, 22.59%); ver Tabla N°5, Según los resultados mostrados en la figura N°4 no hay diferencia significativa entre la mezcla hidroalcohólica 70:30 y el solvente acuoso utilizado para extraer metabolitos polifenólicos ya que las medias 16.95% y 18.88% son cercanas. Por tanto, no hay diferencia en la actividad antioxidante, sin embargo, al comparar los resultados de las medias con la mezcla hidroalcohólica 50:50, si existe una diferencia significativa en la actividad antioxidante, de dichos solventes.

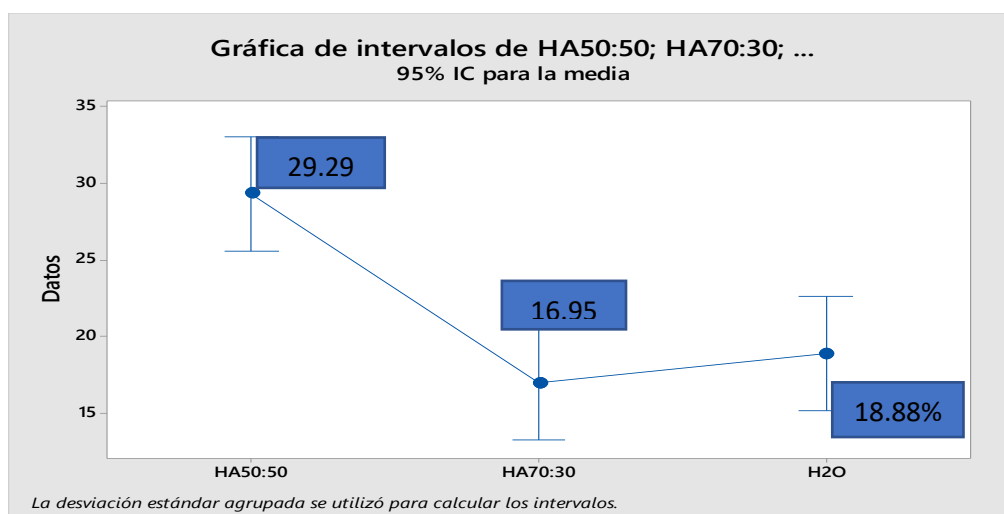


Figura N°17. Gráfica de intervalos para mezcla hidroalcohólica 50:50, mezcla hidroalcohólica 70:30 y solvente acuoso.

5.4.3 Método de análisis Tukey

La tabla N°9 muestra los resultados obtenidos en el método estadístico Tukey el cual respalda la información al rechazar la hipótesis nula que explica que no hay diferencia significativa entre los solventes y la actividad antioxidante; y acepta la hipótesis alternativa que indica diferencia significativa, en los resultados obtenidos de actividad antioxidante por el método ANOVA, el método Tukey muestra que las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Por consiguiente, la mezcla hidroalcohólica 70:30 y el solvente acuoso comparten en la columna de agrupación la letra B que indica que, son significativamente iguales, a diferencia de la mezcla hidroalcohólica 50:50, que refleja que posee una mayor actividad antioxidante de esta manera, se confirma que las medias son diferentes estadísticamente, obteniendo como resultado que la mezcla hidroalcohólica 50:50 es significativamente diferente a la mezcla hidroalcohólica 70:30 y el solvente acuoso, por lo tanto la mezcla hidroalcohólica 50:50 con una media de 29.29 μM posee una mayor actividad antioxidante.

Tabla N°9. Comparaciones en parejas de Tukey con información agrupada utilizando índice confianza del 95%.

Factor	N	Media	Agrupación	
HA50:50	6	29.29	A	
H2O	6	18.88		B
HA70:30	6	16.97		B

Resulta útil esta investigación debido a que se puede verificar que el café tiene alto contenido de polifenoles, que están presentes no solo en el grano sino también en la mayoría de los subproductos obtenidos en el proceso de beneficiado; (este caso la trilla o cascarilla de café), que poseen actividad antioxidante.

Investigaciones anteriores determinaron que los subproductos del café han sido

ampliamente estudiados por diferentes grupos de investigación para identificar y cuantificar los compuestos bioactivos más representativos; uno de estos subproductos es la trilla de café; la descripción de la composición de cada subproducto del café es de gran importancia para permitir la evaluación de estos desechos como posibles ingredientes activos para fines cosméticos, alimenticios y farmacéuticos. Además, se ha reportado la riqueza de metabolitos secundarios, como la cafeína y los polifenoles, en la cáscara ⁽⁶⁾, lo que respalda la teoría aplicada y el resultado de esta investigación; los subproductos del café (pulpa de café, cáscara, piel plateada o trilla) se obtuvieron de la industria de procesamiento del café. Las conservas fenólicas fueron extraídas usando una mezcla de disolventes de isopropanol y agua 60:40 para cada uno de los subproductos de café donde el rendimiento de la conserva fue mayor en el caso de la piel plateada o trilla de café (25%) seguido de la pulpa (19%) y la cáscara de cereza ⁽¹⁰⁾, de esta manera nos respaldan los resultados obtenidos debido a que hay mayor concentración de polifenoles en la trilla de café por estar en contacto con el grano y el mucílago que está compuesto por pectina, proteínas y azúcares sin embargo; en la presente investigación se ha desarrollado una metodología de extracción utilizando etanol ⁽¹²⁾ (solvente que según referencias bibliográficas es el solvente orgánico más apto para la extracción) y agua obteniendo concentraciones de actividad antioxidante de 29.9% para la muestras en mezcla hidroalcohólica 50:50, 18.8% para solvente acuoso y 16.97% para mezcla hidroalcohólica 70:30, descartando completamente el uso del isopropanol y adaptarlo a una metodología de extracción más económica y selectiva con el uso del etanol, obteniendo mayores concentraciones al momento de la extracción.

CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. EL método DPPH determino que existe una diferencia significativa entre cada una de las mezclas, de actividad antioxidante, siendo la mezcla hidroalcohólica etanol: agua 50:50 el mejor solvente de extracción de polifenoles debido a que el etanol es un solvente seguro y junto a una mezcla acuosa genera un control en el proceso de extracción a través del equilibrio y la transferencia de masa.
2. De acuerdo con los resultados estadísticos la mezcla hidroalcohólica etanol: agua 50:50 posee una concentración de 29.29 μM de actividad antioxidante.
3. El ultrasonido es un metodo no destructivo de esta manera se optimizo la extracción de los polifenoles aumentando asi el rendimiento comparado con los métodos convencionales.
4. En esta investigación se con firma la presencia de polifenoles, indicando que los subproductos de café honey como la trilla, son fuentes potenciales de antioxidantes que disminuyen la acción de radicales libres.
5. Los resultados de esta investigación han demostrado que las propiedades antioxidantes de la trilla de café honey pueden ser utilizadas como alternativa para generar un mayor ingreso económico al sector cafetalero y contribuir a mejorar sustancialmente el aprovechamiento de este subproducto en el área farmacéutica, cosmética y alimenticia.

CAPÍTULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Realizar investigaciones para cuantificar polifenoles totales en la trilla de café del beneficiado Honey, utilizando el método folinciocalteu.
2. Efectuar extracciones de polifenoles en subproductos de café, utilizando solventes orgánicos como el alcohol isopropílico, metanol, etanol y acetona y comparar la concentración de actividad antioxidante.
3. Elaborar una propuesta de formulación para la preparación de productos naturales ricos en antioxidantes, utilizando extractos de la trilla de café honey.
4. Promover puntos de tesis para realizar el análisis bromatológico proximal de la trilla de café del beneficiado Honey, y así determinar su composición nutricional para beneficiar al sector ganadero.
5. Proponer la validación del método de determinación de actividad antioxidante mediante espectrofotometría UV-VIS utilizando el reactivo DPPH.

BIBLIOGRAFIA

1. Arroyave, N. D (2015). Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la pulpa de café (*Coffea arabica*) variedad castillo. Caldas Antioquia.
2. Ayala.S.(2018) café para los chalatecos. EDH (en línea) <http://archivo.elsalvador.com/noticias/EDICIONESANTERIORES/2000/JUNIO/jun26/ELPAIS/elpais2.html>.
3. Café boleta. Recuperado el 03 de mayo de 2018. De proceso de beneficiado húmedo: <http://cafeboleta.com/conocimiento/procesos/>
4. Café de Colombia. (2011). Recuperado el 04 de abril de 2018, de El árbol y el entorno: <http://www.cafedecolombia.com>
5. Costa A., Alves R., Vinha A. and Barreira S., (2014). Optimización de la extracción de antioxidantes de la trilla de café, un subproducto de tostado, teniendo en cuenta un proceso sostenible. Cultivos Industriales y Productos. (Portugal). Artículo Científico.
6. Coffee IQ. (2017). Coffe IQ. Recuperado el 03 de mayo de 2018, de procesos del café; <http://www.coffeeiq.co/procesos-del-cafe-lavado-natural-y-honey/>
7. D. Cuesta-Parra, F. Correa Machecha, (2018) Obtención de fenoles a partir de granos verdes de café. Programa de ingeniería química, Fundación Universidad América Bogotá
8. Dabrowska Criado, C, Moya Mir M (2011) Vitaminas y antioxidantes, Saned y ediciones S.L.
9. Determinación del contenido graso de leche en polvo: Extracción Soxhlet. Ciencias Ambientales. Técnicas avanzadas en Química. México.
10. Diaz, N. A., Barcena, A., & Fernandez, E. (s.f.). (2016). Espectrofotometria: espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas.
11. E. Marta Kuskoski, A. Asuero. (2005) Aplicación de diversos métodos

químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos.
Universidad de Sevilla,

- 12.F. Cardona. M. Queipo-Ortuño. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The journal of Nutritional Biochemistry*.
- 13.F. Rincón. (2016). Obtención de antioxidantes a partir del epicarpio de café *Coffea arabica L.* empleando fluidos presurizados, una alternativa de aprovechamiento para este residuo industrial, Universidad Libre, Colombia.
14. Fundamentos de la espectroscopia UV-visible moderna. (2000). En T. Owen, *Conceptos basicos Alemania: Copyringht Agilent Technologies*, pag 2-3.
15. Galanakis, Charis M. (2017) Manual de procesamiento de café: subproductos, aplicaciones sostenibles. Research and Innovation Departament. Gakanikis Laboratories. Pag 3-7
16. J. Fernando Solanilla Duque, O. Lombo, E. Murillo Perea, J. Jairo Méndez Arteaga. (2011). Valoración del potencial antioxidante de *Mollinea racemosa* (romadizo). *Revista Cubana Plantas Medicinales*. Vol. 16. Ciudad de la Habana, Cuba.
17. L. Llacuna y N. Mach, (2011). Papel de los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Estudios de la salud*, Universidad Oberta de Catalunya, Barcelona, España.
18. LM. Amaya Rodríguez, CE. Portillo Membreño. (2013). Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el Ingenio Chaparrastique por el Método de Espectrofotometría Ultravioleta Visible. Facultad de Química Y Farmacia. Universidad de El Salvador.
19. M. Quiñones, M. Miguel y A. Alexandre. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema

cardiovascular. Instituto de Investigación en Ciencias de Alimentación. Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid, España.

20. Murthy P., Naidu M. (2012). Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional Compounds from Coffee Industry By-Products. *Food Bioprocess Technol.* 897-903.
21. Porras-Loaiza, A, López- Malo, A. (2011). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas Selectos de ingenierías de Alimentos*, 121-134.
22. Valenzuela Landaeta, K., & Espinoza Piombo, M. (2012). Estrés oxidativo, carcinogénesis cutánea por radiación solar y quimioprotección con polifenoles. *Formacion continuada en dermatologia*, 446-452.

ANEXOS

ANEXO N°1.
Sitio de muestreo

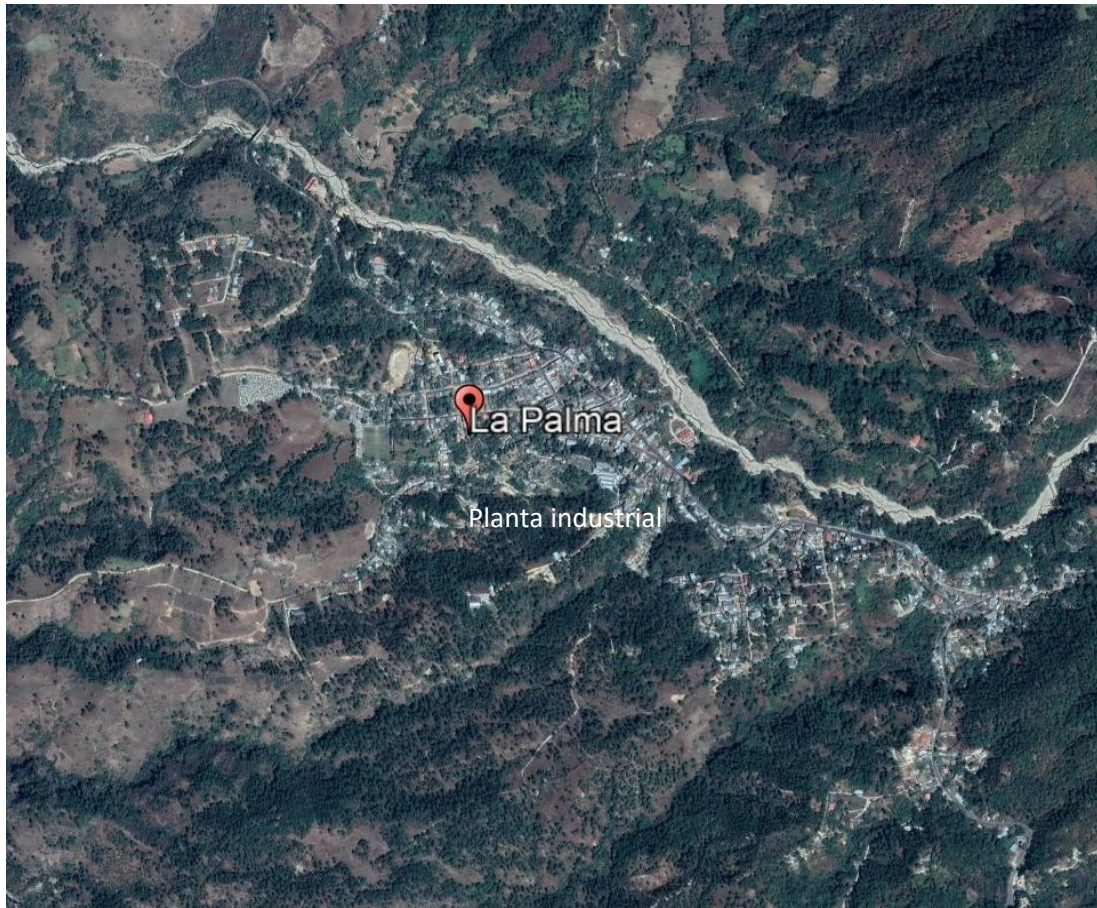


Figura N°18. Ubicación geográfica de sitio de muestreo, Caserío el Zarzal, Cantón El Gramal, Municipio la Palma, Chalatenango, Centro América. Vista 800m

ANEXO N°2.

Esquema de los procesos de beneficiado de café

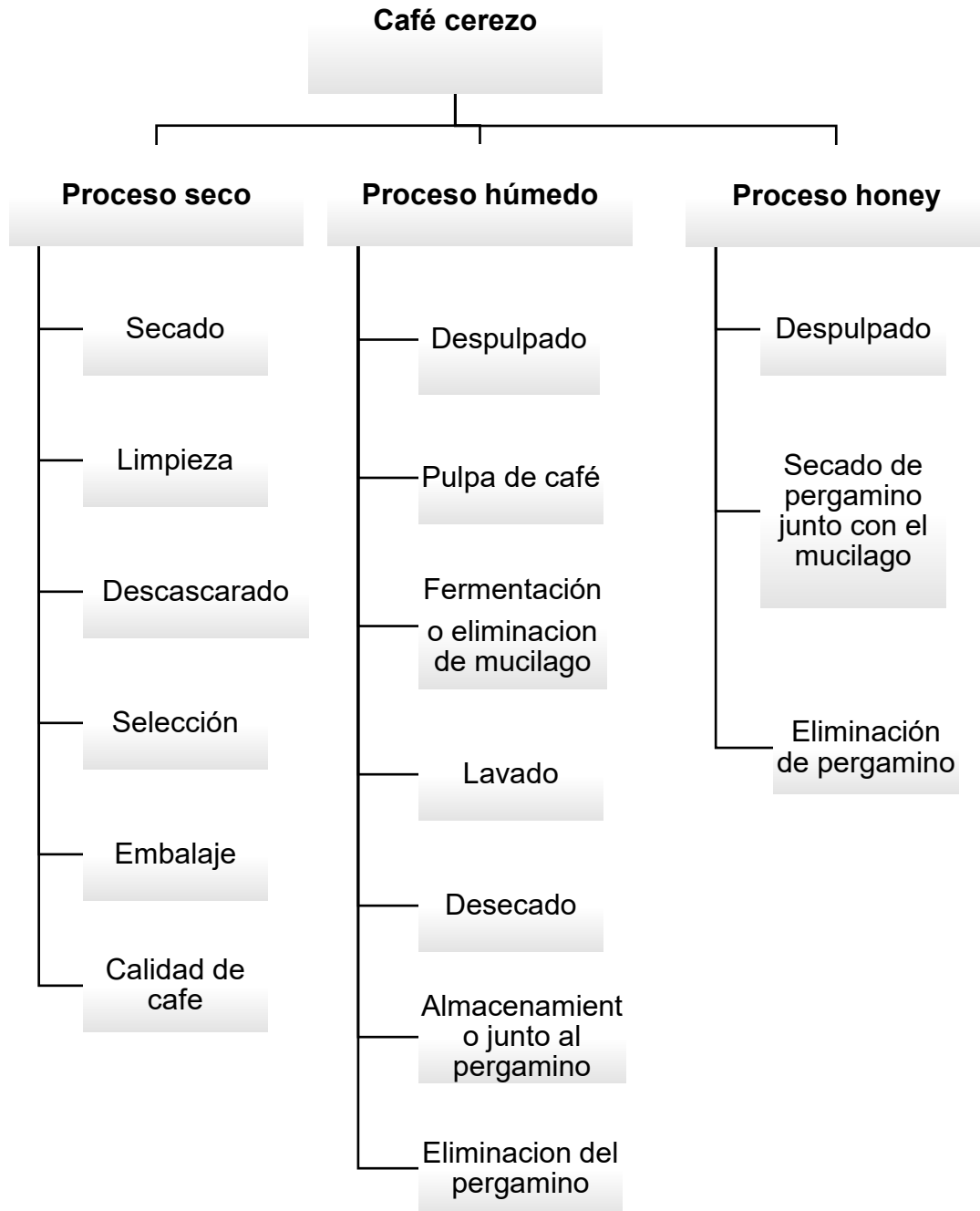


Figura N°19. Esquema del proceso de beneficiados del café

ANEXO N°3

ENTREVISTA REALIZADA A PROPIETARIO DE FINCA INDUSTRIAL IBIZA

Determinación de actividad antioxidante de polifenoles en la trilla de *coffea arabica* (café) del Beneficiado Honey procedente de la planta industrial IBIZA.

Fecha: 25 de abril de 2019

Empresa: Finca Industrial IBIZA **Nombre del entrevistado:** Sr. Carlos Murcia

Ubicación: Caserío el Zarzal, Cantón el gramal, La Palma, Chalatenango

Altura: 1380 msnm y 1400 msnm

Objetivo: Recopilar información de cómo se realiza el beneficiado Honey, para obtener trilla de café en planta industrial Ibiza.

Preguntas:

- 1. ¿En qué año se fundó la planta industrial IBIZA, y quien fue su fundador?**

La planta nace en enero de 2015, los fundadores familia Murcia Lemus

- 2. ¿Qué variedades de café utilizan para obtener café honey?**

Variedad pacamara: Cruce propio salvadoreño tiene más de 50 años

Variedad Pacas

Variedad Borbón

Variedad Catimor

3. ¿En qué condiciones climáticas se realiza la cosecha y en qué mes del año?

Se realiza en la época seca o en el verano, de noviembre a febrero.

4. ¿Qué es el café Honey?

Es un café que mantiene el mucílago en la superficie de su pergamino, de su corteza del grano después de haber sido procesado por una máquina, y es llevado a 11 ° C en las camas secadoras, luego ese tipo de café, para saber si tiene las características de un café distinto al que se comercializa como los lavados, es catado por los expertos donde dan su característica organoléptica de la bebida, al final son ellos quienes dicen que tipo de café es, sus condiciones de grano, y los atributos del grano o defectos si los hubiera.

5. ¿Cuándo inició el Beneficiado de café Honey?

Nace en el país a finales del 2010 y hasta el momento llevamos ya 9 años con el proceso.

6. ¿Qué los motivó a trabajar con el Café Honey?

La conservación a los ecosistemas y no contaminación. Como valor agregado el incremento en las ventas de café ya que se paga el triple de un café normal de una buena variedad de café.

7. ¿Qué subproductos o residuos obtienen del beneficiado de café Honey?

Subproductos: licor de café

Residuos: trilla, que sirve como abono orgánico.

8. ¿Cuáles son algunas ventajas y desventajas del Beneficiado Honey

con respecto a otros beneficiados?

Dentro de las ventajas que se obtienen al realizar el proceso honey con respecto al beneficiado por vía seca y por vía húmeda, es que reduce la contaminación evitando la proliferación de toxinas en el medio ambiente. Además, no se somete al calentamiento; de esta manera se evita el daño colateral al grano, también aumenta la calidad del café, ya que el grano genera un color característico que lo obtiene por la composición de la miel adherida al mucílago, así mismo el sabor del café es diferente con respecto al obtenido a través de los otros beneficiados, otra ventaja del beneficiado honey en cuanto al beneficiado por vía seca, es que se realiza en camas secadoras bajo un techo de vidrio donde no penetren directamente rayos solares, sino más bien donde se mantenga la temperatura oscilante entre 11 ° C aproximadamente; Caso contrario con el beneficiado por vía seca (el cual debe de realizarse el proceso de secado bajo el sol en patios) y con relación al beneficiado por vía húmeda (en este procedimiento se realiza el despulpado seguido de la fermentación) donde este requiere abundante agua y un equipo técnico específico para la realización del proceso.

Dentro de las desventajas del beneficiado honey se da en la etapa del despulpado, ya que, si se deja muy gruesa la capa de mucílago, entonces el café sufre daños, además la miel en el grano puede permanecer fresco, y durante un tiempo puede correr el riesgo que dañe el grano porque puede provocar el crecimiento de hongos y levaduras, otra desventaja es que el secado debe de realizarse en época no lluviosa.

9. ¿Cuál es el proceso para realizar el Beneficiado de café Honey?

El proceso consiste en que se recolecta la uva madura, se selecciona que no lleve granos con daños físicos, después de esa selección de granos pasa por el despulpado, quitando la corteza roja del grano, se lleva el café ya procesado a las camas secadoras de café, no se necesita agua ni es necesario realizar otro

proceso.

10. ¿Dentro del proceso, ¿cuál sería un punto crítico para el tratamiento del café Honey?

Las condiciones climáticas, la humedad y el calor son puntos críticos para el café honey.

11. ¿Cuáles son las características fundamentales del grano de café Honey?

Superficie cubierta por completo de miel o cristales de miel, de azúcares del grano de café o mucílago.

12. ¿Qué es la trilla o cascarilla de café?

Tegumento del grano obtenido como subproducto.

13. ¿Qué equipo utilizan para el trillado de café?

Máquina girada por corriente eléctrica.

14. ¿Para usted qué importancia tiene la trilla de café?

Es básica, para utilizarla como abono orgánico.

15. ¿Qué utilidad le dan a la trilla de café que obtienen en el Beneficiado Honey?

Pasa a formar parte de la materia orgánica.

16. ¿Cómo almacenan la trilla de café y en qué condiciones?

Se almacena en lugar seco o en costales de nylon y luego es llevado a los cafetales.

Nota: La planta Industrial cuenta con una extensión territorial de aproximadamente 12 manzanas y se obtienen de 15 a 18 quintales por manzana.

ANEXO N°4

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA DE TRILLA DE CAFÉ HONEY.



Se Traslada al lugar de muestreo (Planta Industrial Ibiza).



Se realiza un muestreo Dirigido.



Se recolecta 100 g de muestra de trilla, en tres bolsas de cierre hermético de tres libras.

Figura N°20. Esquema del proceso de recolección de la muestra de trilla de café honey.

ANEXO N°5

ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA DE TRILLA DE CAFÉ HONEY.

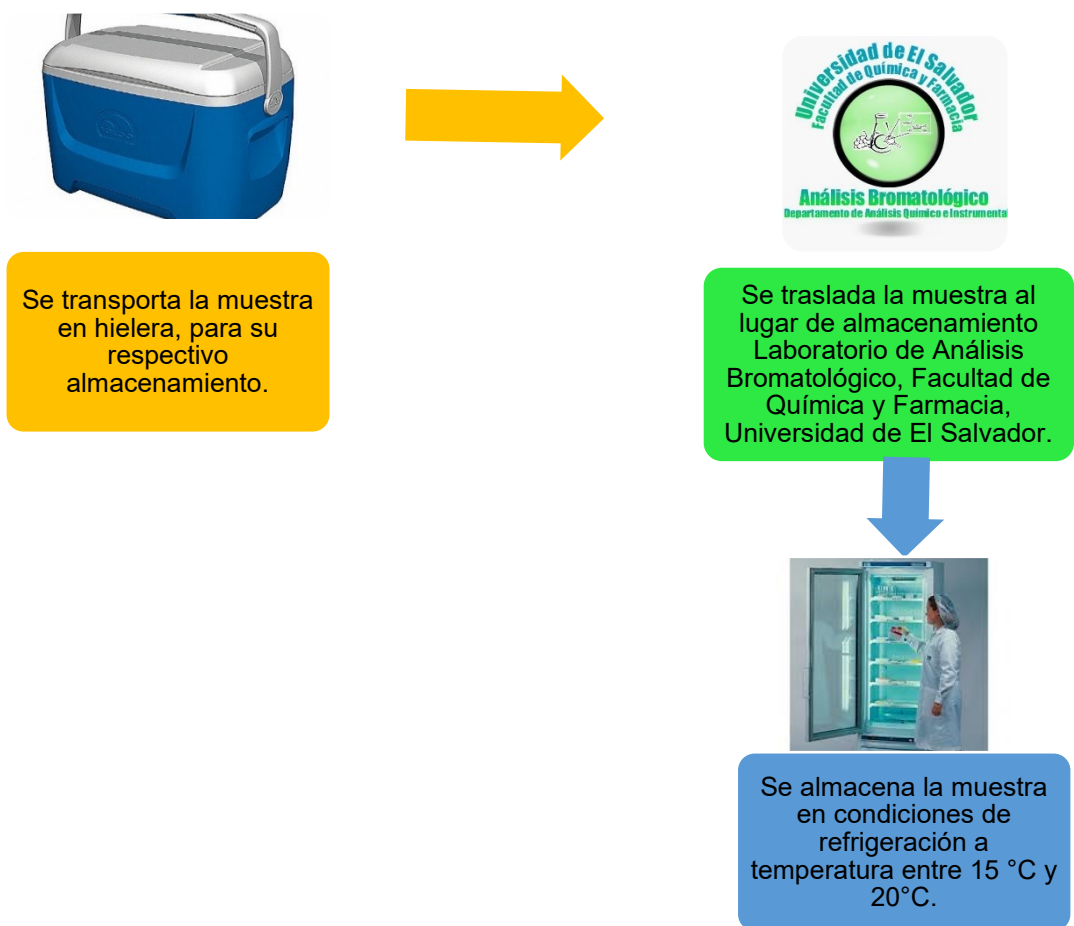


Figura N°21. Esquema del Almacenamiento de la muestra.

ANEXO N°6
MATERIALES, EQUIPO Y REACTIVOS

Materiales

- Bolsas plásticas (3)
- Hielera (1)
- Tamiz (1)
- Erlenmeyer (6)
- Probeta de 250 mL (1)
- Probeta de 500 mL (1)
- Beaker de 250 mL (1)
- Balones Volumetricos de 500 mL (3)
- Papel aluminio (2)
- Papel Whatman #42 (6)
- Papel toalla (3)
- Tubos de centrifua (6)
- Celda de plástico (12)
- Pipeta volumétrica de 25 mL (1)
- Pipeta volumétrica de 10 mL (1)
- Micropipeta de 1 ml (6)
- Balón volumétrico de 100 mL (2)
- Balón volumétrico de 50 mL (6)

Equipos

- Balanza granataria
- Refrigeradora
- Licuadora con aspas de acero inoxidable (1)
- Desecador
- Ultrasonido
- Genevac EZ 2 Plus
- Balanza semianalitica
- Balanza analítica
- espectrofotómetro UV

Reactivos

- Etanol
- Agua ultrapura
- Reactivo DPPH
- Estándar Trolox

ANEXO N°7

PREPARACION DE LA MUESTRA DE TRILLA DE CAFÉ HONEY ANTES DE LA EXTRACCION.



Figura N°22. Esquema de preparación de la muestra de trilla de café honey antes de la extracción.

ANEXO N°8

PREPARACIÓN DE LAS MEZCLAS DE SOLVENTES PARA LA EXTRACCIÓN DE METABOLITOS.

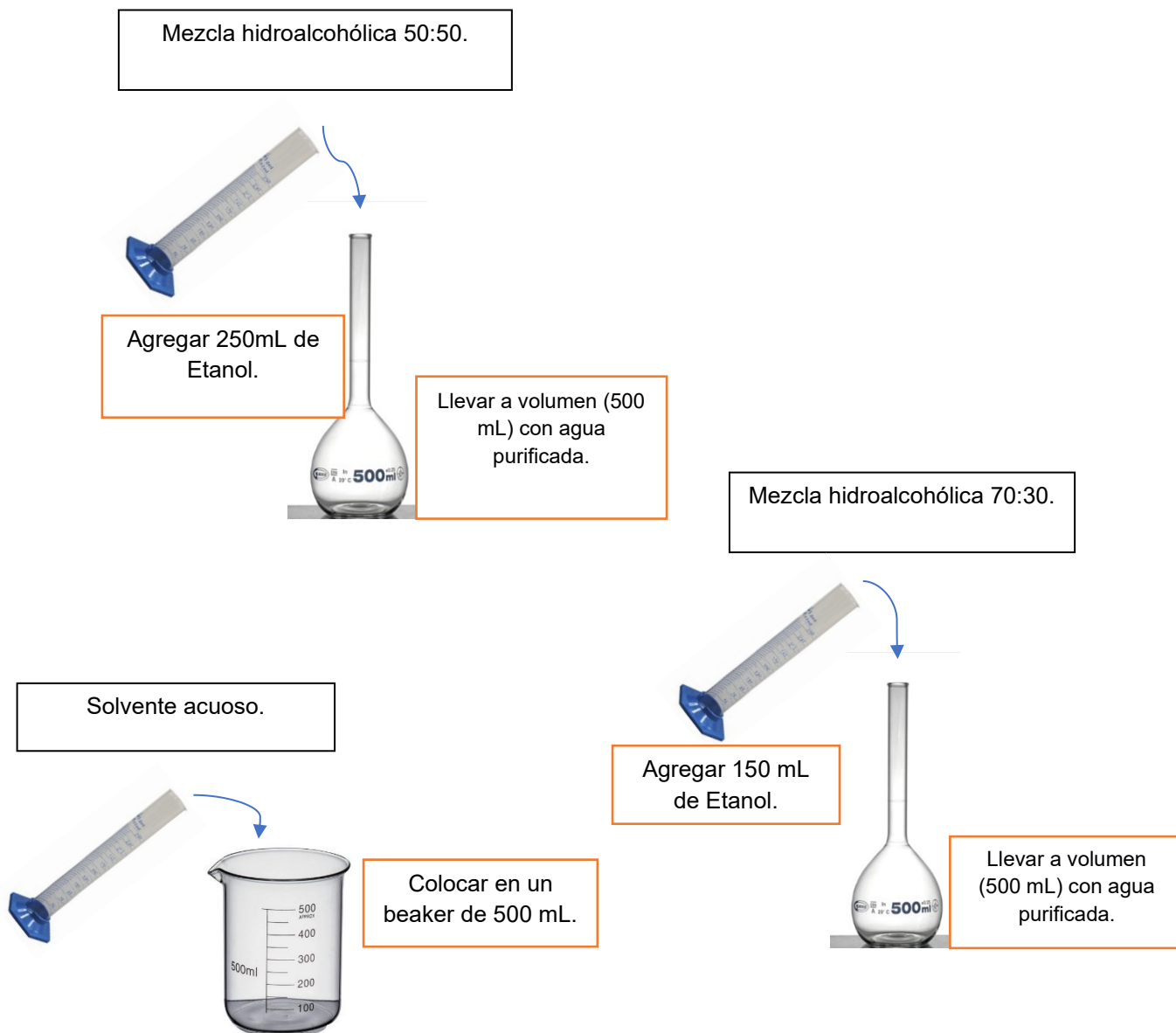


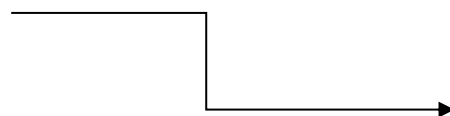
Figura N°23. Esquema de preparación de mezclas.

ANEXO N°9

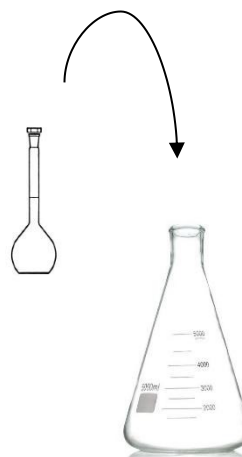
EXTRACCIÓN DE METABOLITOS POLIFENOLICOS



Pesar 1.25 g de
Mx.



Agregar 5 g de muestra
y 200 mL de mezcla
hidroalcohólica (50:50).



Mezcla
hidroalcohólica
50:50

Colocar las
muestras en el
ultrasonido.



Condiciones
Potencia: 100 w
Temperatura: 25°C
Frecuencia: 37 Hz.



Figura N°24. Esquema de extracción de metabolitos polifenolicos.

ANEXOS N°10.
CODIGOS DE IDENTIFICACION DE MUESTRAS.

Tabla N°10. Códigos de identificación para extracción de muestras, pesado de muestras, lecturas de muestras.

Código de identificación de muestras	
Muestra	Código
Extracción con mezcla hidroalcohólica 50:50	50:50 MX-1 50:50 MX-2 50:50 MX-3
Extracción con mezcla hidroalcohólica 70:30	70:30MX-1 70:30MX-2 70:30MX-3
Extracción con mezcla hidroalcohólica 50:50	H2OMX-1 H2OMX-2 H2OMX-3

ANEXO N°11
PESOS OBTENIDOS DE MUESTRA DE TRILLA DE CAFÉ

Tabla N°11. Resultados obtenidos de pesos de muestra de trilla de café

MUESTRAS HIDROALCOHOLICA 50:50						
Muestra	Fecha	Hora inicial	Hora final	Peso	T°	H%
50:50MX-1	23-05-2019	2:05 pm	2:08 pm	1.2509 g	23°C	50%
50:50MX-2	23-05-2019	2:10 pm	2:14 pm	1.2501 g	23°C	50%
MUESTRAS HIDROALCOHOLICA 70:30						
Muestra	Fecha	Hora inicial	Hora final	Peso	T°	H%
70:30MX-1	23-05-2019	2:15 pm	2:19 pm	1.2529 g	23°C	50%
70:30MX-2	23-05-2019	2:20 pm	2:25 pm	1.2562 g	23°C	50%
MUESTRAS ACUOSO						
Muestra	Fecha	Hora inicial	Hora final	Peso	T°	H%
H2OMX-1	23-05-2019	2:21 pm	2:26 pm	1.2509 g	23°C	50%
H2OMX-2	23-05-2019	2:27 pm	2:31 pm	1.2544 g	23°C	50%

ANEXO N°12 RECUPERACION DEL EXTRACTO

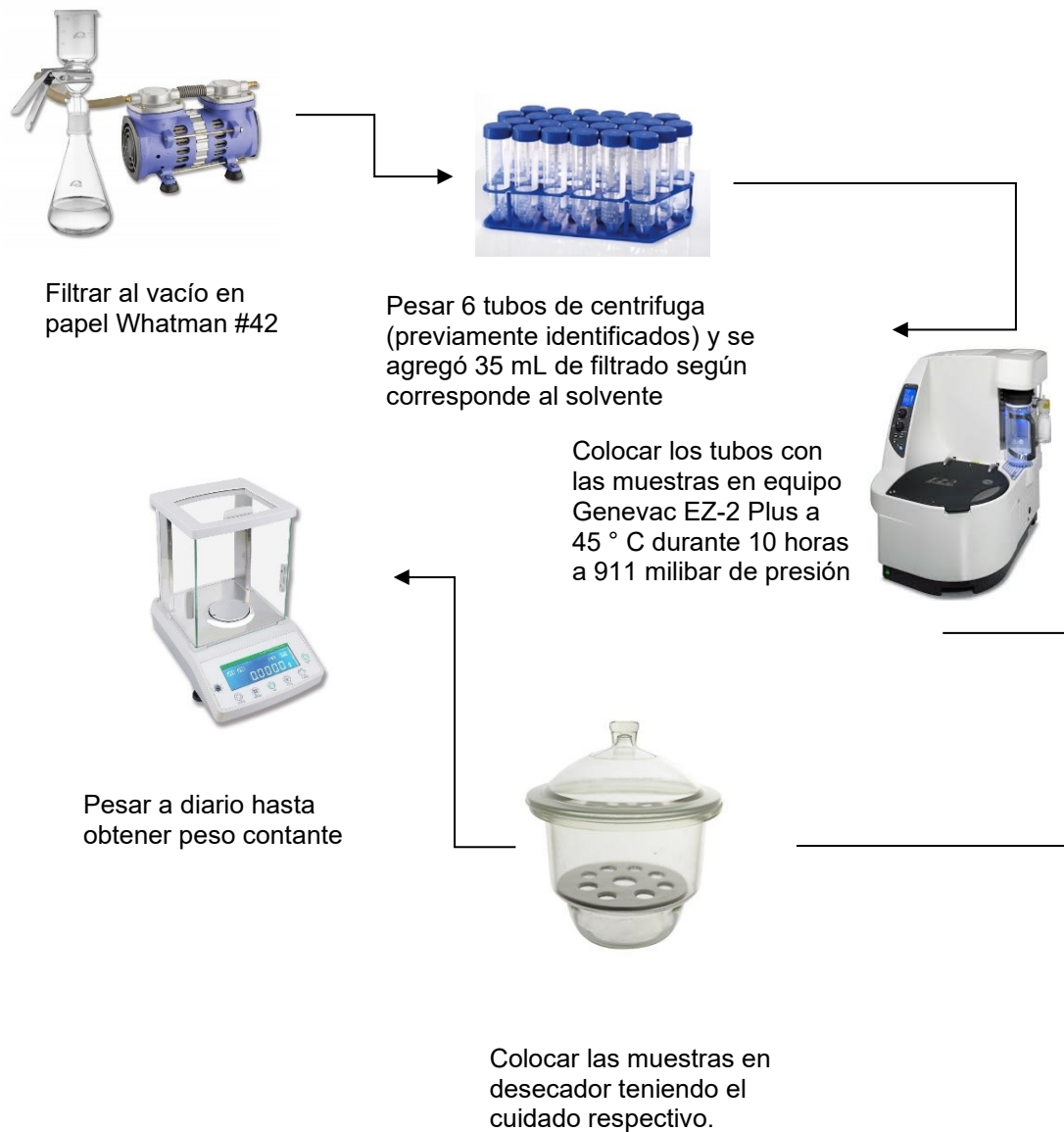


Figura N°25. Esquema de recuperación del extracto.

ANEXOS N°13

Resultados de pesos constantes de tubos de centrifugas con muestra de extracto recuperado de trilla de café Honey para muestra extraídas con mezcla hidroalcohólica 50:50, mezcla hidroalcohólica 70:30 y solvente acuoso

Tabla N°12. Resultados de pesos constantes de tubos de centrifugas con muestra de extracto recuperado de trilla de café Honey para muestra hidroalcohólica 50:50 MX1, muestra hidroalcohólica 70:30 MX1 y solvente acuoso MX1.

MUESTRAS HIDROALCOHOLICA 50:50MX1					
FECHA	HORA INICIAL	HORA FINAL	PESO	TEMPERATURA	HUMEDAD
23-05-2019	3:05 pm	3:09 pm	60.2838 g	25.1 ° C	45%
24-05-2019	2:25 pm	2:30 pm	60.2740 g	26.2 ° C	46%
27-05-2019	2:37 pm	2:40 pm	60.2720 g	25.3 ° C	46%
19-06-2019	2:03 pm	2:09 pm	60.2644 g	25.3 ° C	45%
20-06-2019	3:06 pm	3:12 pm	60.2597 g	25.1 ° C	45%
MUESTRAS HIDROALCOHOLICA 70:30MX1					
FECHA	HORA INICIAL	HORA FINAL	PESO	TEMPERATURA	HUMEDAD
23-05-2019	3:10 pm	3:14 pm	60.3562 g	25.1 ° C	45%
24-05-2019	2:30 pm	2:33 pm	60.3466 g	26.2 ° C	46%
27-05-2019	2:37 pm	2:40 pm	60.3462 g	25.3 ° C	46%
19-06-2019	2:10 pm	2:13 pm	60.3355 g	25.3 ° C	45%
20-06-2019	3:13 pm	3:15 pm	60.3323 g	25.1 ° C	45%
MUESTRAS CON SOLVENTE ACUOSO MX1					
FECHA	HORA INICIAL	HORA FINAL	PESO	TEMPERATURA	HUMEDAD
23-05-2019	3:10 pm	3:14 pm	60.3562 g	25.1 ° C	45%
24-05-2019	2:30 pm	2:33 pm	60.3466 g	26.2 ° C	46%
27-05-2019	2:37 pm	2:40 pm	60.3462 g	25.3 ° C	46%
19-06-2019	2:10 pm	2:13 pm	60.3355 g	25.3 ° C	45%
20-06-2019	3:13 pm	3:15 pm	60.3353 g	25.1 ° C	45%

Tabla N°13. Resultados de pesos constantes de tubos de centrifugas con muestra de extracto recuperado de trilla de café Honey para muestra hidroalcohólica 50:50 MX2, muestra hidroalcohólica 70:30 MX2 y solvente acuoso MX2.

MUESTRAS HIDROALCOHOLICA 50:50MX2					
FECHA	HORA INICIAL	HORA FINAL	PESO	TEMPERATURA	HUMEDAD
23-05-2019	3:10 pm	3:12 pm	60.2826 g	25.1 ° C	45%
24-05-2019	2:30 pm	2:33 pm	60.2820 g	26.2 ° C	46%
27-05-2019	2:40 pm	2:43 pm	60.2719 g	25.3 ° C	46%
19-06-2019	2:13 pm	2:16 pm	60.2615 g	25.3 ° C	45%
20-06-2019	3:15 pm	3:18 pm	60.2543 g	25.1 ° C	45%

MUESTRAS SOLVENTE ACUOSO MX2					
FECHA	HORA INICIAL	HORA FINAL	PESO	TEMPERATURA	HUMEDAD
23-05-2019	3:14 pm	3:19 pm	60.6584 g	25.1 ° C	45%
24-05-2019	2:33 pm	2:35 pm	60.6560 g	26.2 ° C	46%
27-05-2019	2:41 pm	2:44 pm	60.6307 g	25.3 ° C	46%
19-06-2019	2:13 pm	2:17 pm	60.6280 g	25.3 ° C	45%
20-06-2019	3:15 pm	3:18 pm	60.6274 g	25.1 ° C	45%

MUESTRAS HIDROALCOHOLICA 70:30MX2					
FECHA	HORA INICIAL	HORA FINAL	PESO	TEMPERATURA	HUMEDAD
23-05-2019	3:17 pm	3:20 pm	60.5333 g	25.1 ° C	45%
24-05-2019	2:33 pm	2:36 pm	60.5325 g	26.2 ° C	46%
27-05-2019	2:40 pm	2:45 pm	60.5202 g	25.3 ° C	46%
19-06-2019	2:13 pm	2:18 pm	60.5102g	25.3 ° C	45%
20-06-2019	3:15 pm	3:19 pm	60.5097 g	25.1 ° C	45%

ANEXO N°14
PREPARACION DE REACTIVO DPPH 0.005 M

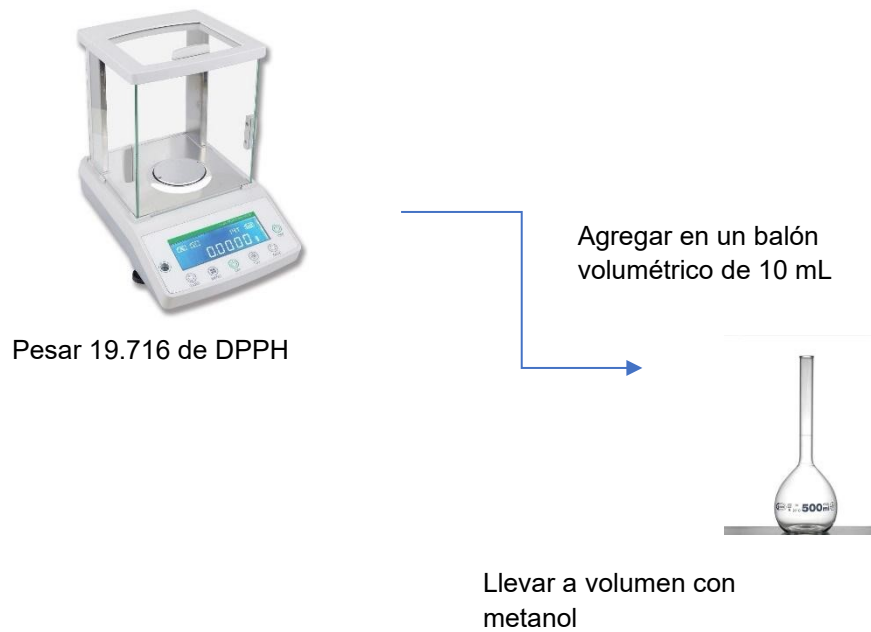


Figura N°26. Esquema de preparación de solución DPPH 0.005 M.

ANEXO N°15

Cuantificación de actividad antioxidante por medio del método DPPH.

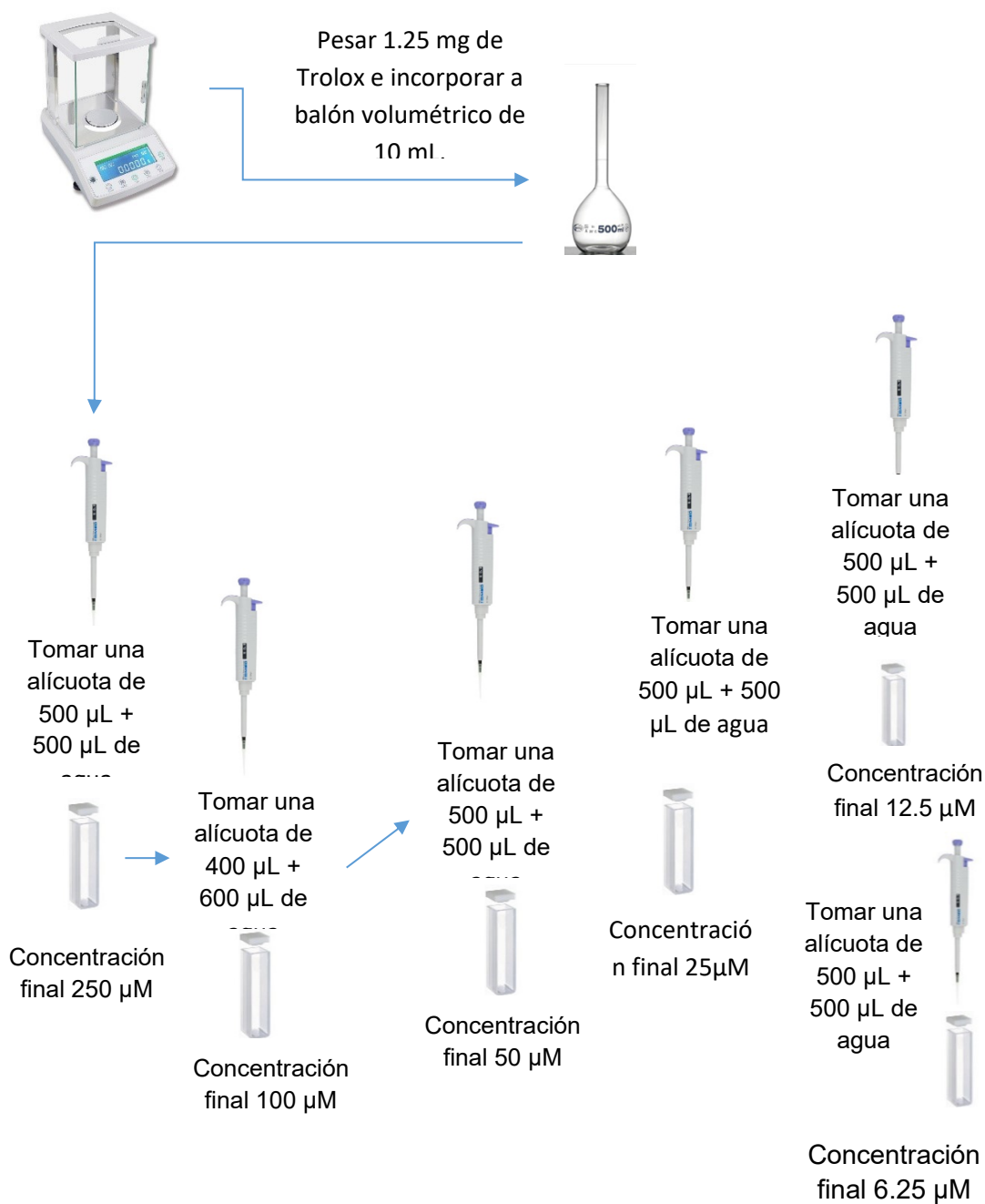
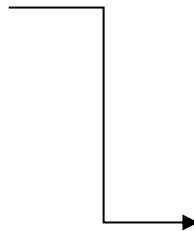


Figura N°27. Esquema de curva de calibración.

ANEXO N°16
PREPARACION DE MUESTRA DE EXTRACTO RECUPERADO DE
TRILLA DE CAFE



Pesar 20 mg de muestra de trilla.



Agregar a un balón volumétrico de 10 mL, llevo a volumen con agua ultrapura.

Figura N°28. Esquema de preparación de muestra de extracto recuperado de trilla de café honey.

ANEXO N°17

LECTURA DE LA MUESTRA DE EXTRACTO RECUPERADO DE TRILLA DE CAFE



Encender el espectrofotómetro

Condiciones para lectura

Configurar la lectura a 515 nm
Calibrar con agua ultra pura verificando la lectura a 0.000

Estándar Trolox

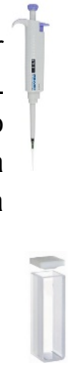
A 6 celdas de plástico agregar 50 μ L de las soluciones preparadas a las siguientes concentraciones: 250 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12.5 μ M, 6.25 μ M, 0 μ M de Trolox respectivamente y se le agregará 950 μ L de DPPH a cada una de las celdas de plástico.



Realizar la lectura de curva de calibración a 515 nm.

Muestra de extracto recuperado de trilla de café Honey

A 9 celdas de plástico agregar 950 μ L de DPPH y agregar 50 μ L de muestra de extracto recuperado de trilla de café a partir de mezcla hidroalcohólica 50:50.



Realizar la lectura de la muestra de extracto recuperado de trilla de café honey a 515 nm.

Figura N°29. Esquema de determinación de actividad antioxidante por medio de DPPH.

ANEXO N°18
RESULTADOS DE ABSORBANCIAS OBTENIDAS DE CURVA DE
CALIBRACIÓN Y MUESTRAS

.

Tabla N°14. Curva de calibración.

Concentración en μM (micromoles)	Absorbancia
250.00 μM	0.299
100.00 μM	0.465
50.00 μM	0.523
25.00 μM	0.550
12.50 μM	0.561
6.25 μM	0.566
0.00 μM	0.570

r

Tabla N°15. Absorbancias obtenidas en mezcla hidroalcohólica 50:50.

Muestra hidroalcohólica 50:50	
Muestra	Absorbancia
50:50MX1-1	0.551
50:50MX1-2	0.551
50:50MX1-3	0.556
50:50MX2-1	0.538
50:50MX2-2	0.539
50:50MX2-3	0.538

Tabla N°16 Resultados de absorbancias obtenidas en mezcla hidroalcohólica 70:30.

Muestra hidroalcohólica 70:30	
Muestra	Absorbancia
70:30MX1-1	0.554
70:30MX1-2	0.552
70:30MX1-3	0.561
70:30MX2-1	0.561
70:30MX2-2	0.555
70:30MX2-3	0.556

Tabla N°17. Resultados de absorbancias obtenidas en solvente acuoso

Muestra solvente acuoso	
Muestra	Absorbancia
H ₂ O MX1-1	0.554
H ₂ O MX1-2	0.552
H ₂ O MX1-3	0.561
H ₂ O MX2-1	0.561
H ₂ O MX2-2	0.555
H ₂ O MX2-3	0.556

ANEXO N°19
RECOPIACIÓN DE IMÁGENES DE LOS PROCESOS REALIZADOS.



Figura N°30. Almacenamiento de trilla en Planta Industrial IBIZA.



Figura N°31. Trilla de café de beneficiado Honey.



Figura N°32. Pesado de muestra (trilla de café) en Balanza granataria.



Figura N°33. Micronizado de trilla en licuadora con
aspas de acero inoxidable

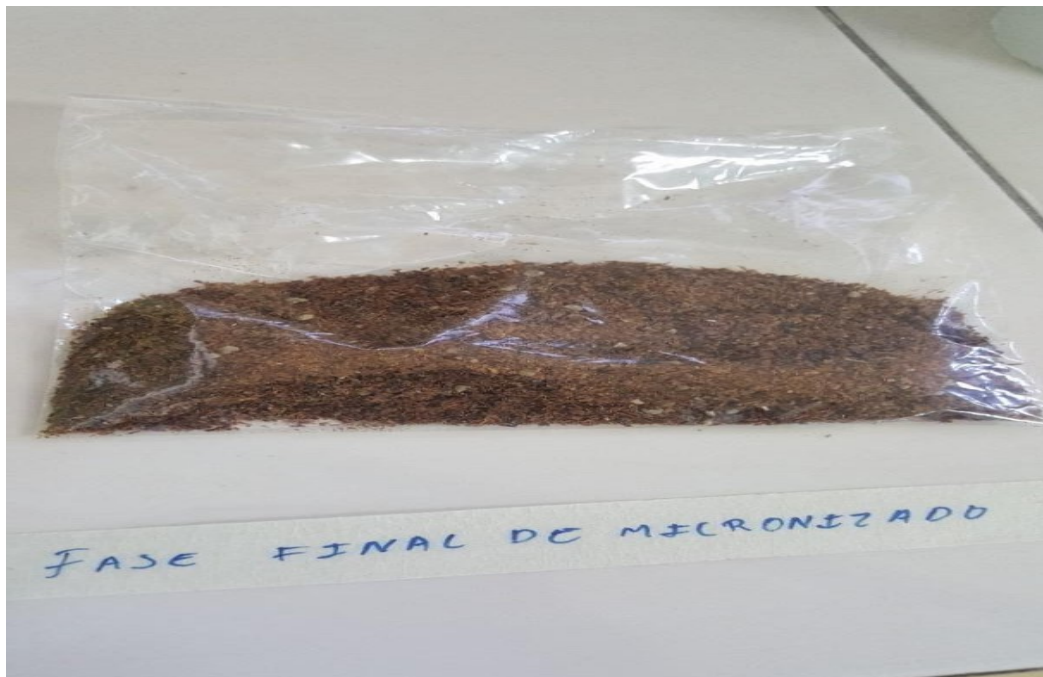


Figura N°34. Trilla micronizada en licuadora con aspas de acero inoxidable.



Figura N°35. Preparación de la mezcla hidroalcohólica 50:50

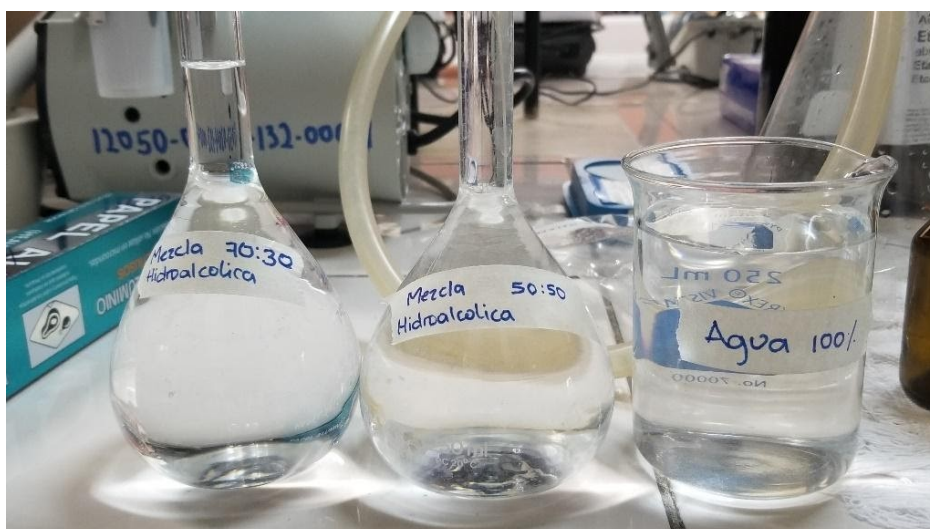


Figura N°36. Preparación de mezcla hidroalcohólica 50:50, mezcla hidroalcohólica 70:30 y solvente acuoso



Figura N°37. Pesado de trilla de café para proceder a la extracción de metabolitos



Figura N°38. Después de pesar la muestra
Se colocó en Erlenmeyer para
proceder a la extracción de metabolitos.



Figura N°39. Protección de muestras
para evitar deterioro de metabolitos
por causa de factores externos



Figura N°40. Preparación de muestras para poner a ultrasonido.



Figura N°41. Muestras en ultrasonido para extracción de metabolitos a analizar.



Figura N°42. Recuperación del extracto, utilizando bomba al vacío

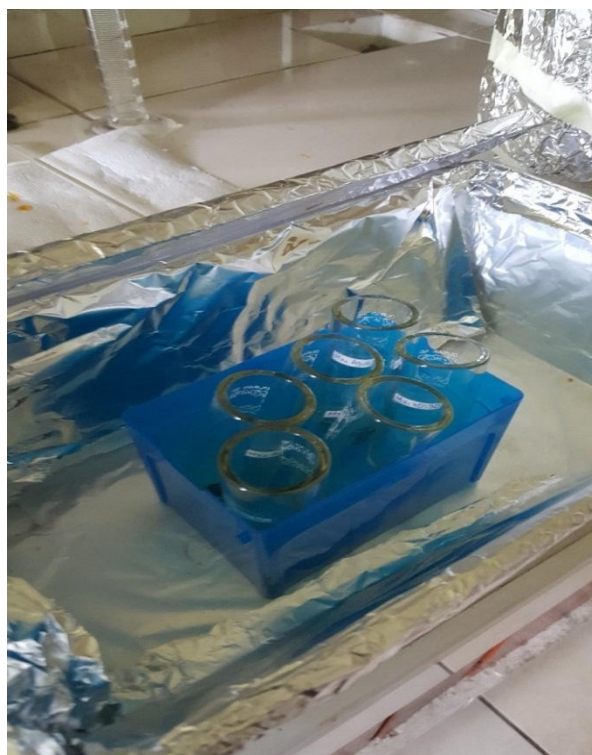


Figura N°43. Después de recuperado el extracto se deposita el filtrado en tubos de centrifugado



Figura N°44. Configuración de equipo Genevac con las condiciones para su funcionamiento.



Figura N°45. Las muestras se concentran en Equipo Genevac Plus



Figura N°46. Muestras colocadas en equipo retroevaporador Genevac EZ-Plus para obtener muestras a analizar.



Figura N°47. Preparación de curva de calibración y preparación de las muestras.



Figura N°48. Preparación de las muestras para la determinación de actividad antioxidante.



Figura N°49. Preparación de las muestras para la determinación de actividad antioxidante.



Figura N°50. Incorporación de muestra en celdas de plástico, previo a analizar.



Figura N°51. Evidencia de cambio de color de morado a amarillo por presencia de antioxidantes.

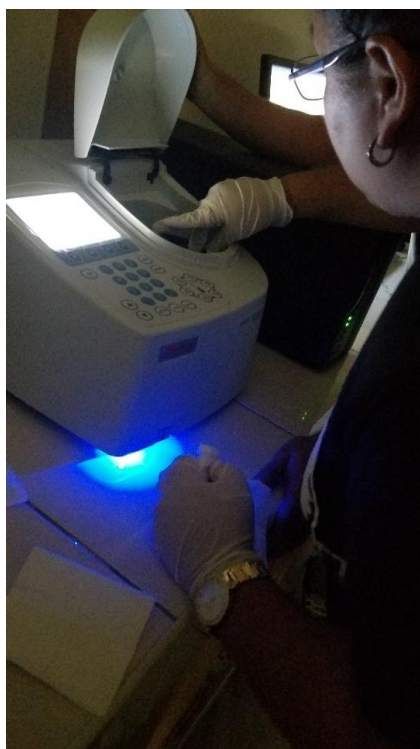


Figura N°52. Lecturas de muestras en espectrofotómetro UV-VIS marca Genesys 10S UV-vis Serie 2L5u331210.